

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Maria Patrícia do Nascimento**

**Investigação de malondialdeído livre e total por eletroforese capilar visando a análise de amostras de urina e plasma**

**Juiz de Fora**

**2025**

**Maria Patrícia do Nascimento**

**Investigação de malondialdeído livre e total por eletroforese capilar visando a análise de amostras de urina e plasma**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nascimento, Maria Patrícia do.

Investigação de malondialdeído livre e total por eletroforese capilar visando a análise de amostras de urina e plasma / Maria Patrícia do Nascimento. -- 2025.

111 f. : il.

Orientador: Marccone Augusto Leal de Oliveira

Coorientador: Claudio Teodoro de Souza

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, ICE/Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Química, 2025.

1. Eletroforese capilar. 2. Malondialdeído. 3. Urina. 4. Plasma. I. Oliveira, Marccone Augusto Leal de, orient. II. Souza, Claudio Teodoro de, coorient. III. Título.

**Maria Patrícia do Nascimento**

**"Investigação de malondialdeído livre e total por eletroforese capilar visando a análise de amostras de urina e plasma"**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em 12 de fevereiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira** - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza**

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Luciano Vitali**

Universidade Federal de Santa Catarina

**Profa. Dra. Gisele André Baptista Canuto**

Universidade Federal da Bahia

**Prof. Dr. Dosil Pereira de Jesus**

Universidade Estadual de Campinas

**Prof. Dr. Ana Carolina de Oliveira Costa**  
Universidade Federal de Santa Catarina

Juiz de Fora, 24/01/2025.



Documento assinado eletronicamente por **GISELE ANDRE BAPTISTA CANUTO, Usuário Externo**, em 12/02/2025, às 18:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina de Oliveira Costa, Usuário Externo**, em 12/02/2025, às 18:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano Vitali, Usuário Externo**, em 12/02/2025, às 18:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Dosil Pereira de Jesus, Usuário Externo**, em 12/02/2025, às 18:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcone Augusto Leal de Oliveira, Professor(a)**, em 12/02/2025, às 20:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Teodoro de Souza, Professor(a)**, em 13/02/2025, às 14:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2210562** e o código CRC **483F3896**.

Dedico este trabalho à minha mãe Maria das Mercês (*in memoriam*) e ao meu pai José Patrício, com todo meu amor e gratidão, por serem a minha inspiração e por estarem sempre ao meu lado, me apoiando, para que eu pudesse realizar meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus por me iluminar, proteger e guardar.

À minha mãe Maria das Mercês (*in memoriam*) e ao meu pai, José Patrício, meus maiores exemplos de vida. Por todo amor, carinho, dedicação, compreensão e cuidado. Por todos os conselhos, por sempre acreditarem em mim e me apoiar.

Ao meu irmão José Cláudio, pela amizade.

Ao meu orientador, Marcone, pela paciência, ensinamentos e amizade. Por acreditar em mim e no meu potencial e me ajudar a crescer pessoal e profissionalmente.

Ao meu coorientador, Claudio, pela paciência, ensinamentos e amizade.

Aos colegas do Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ) pelo companheirismo, amizade e ensinamentos.

Aos amigos, por estarem sempre ao meu lado e me ajudarem a construir momentos especiais e felizes.

Aos companheiros de graduação e pós-graduação.

Aos membros da banca de qualificação e defesa por terem aceitado o convite de participação e pelas contribuições e sugestões.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Instituto de Ciências Exatas, em especial ao Departamento de Química. Aos professores e demais funcionários, pela dedicação e por todos os ensinamentos.

Às agências de fomento pelo apoio financeiro.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

## RESUMO

O malondialdeído (MDA) é o biomarcador mais utilizado da peroxidação lipídica, sendo essencial o desenvolvimento de métodos seletivos, confiáveis e rápidos para a sua determinação em amostras biológicas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e otimização de um método por Eletroforese Capilar de Zona com detecção direta no UV (CZE – UV) para a determinação do biomarcador MDA em amostras de urina de indivíduos submetidos ao teste de COVID-19 e em amostras de plasma de indivíduos sob suplementação de ômega 3. A mobilidade eletroforética do MDA foi determinada pela primeira vez, o que se mostrou de suma importância para o desenvolvimento do método por CZE – UV. A implementação de uma curva de mobilidade efetiva x pH em conjunto com simulação no *software* PeakMaster<sup>®</sup> permitiram determinar as condições experimentais mais adequadas para a análise. Assim, o *background electrolyte* (BGE) otimizado foi composto por TRIS 40 mmol L<sup>-1</sup>, HCl 20 mmol L<sup>-1</sup> e CTAB 2,5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8,0). Foi verificado que o MDA apresenta boa absorção na região do UV, dessa forma ele foi monitorado à 266 nm. Com essas condições, o MDA foi detectado em cerca de 1 min, de forma que este seria o método para determinação de MDA em amostras biológicas por Eletroforese Capilar (CE) com o menor tempo de migração já desenvolvido. Não foi possível detectar o sinal do MDA livre nas amostras de urina e plasma, mesmo com a implementação de uma pré-concentração do analito utilizando a técnica de injeção de amostra amplificada por campo (FASI). O planejamento de experimentos Box-Behnken foi aplicado para a otimização da pré-concentração. Os fatores avaliados nesse planejamento foram a concentração do BGE, a voltagem aplicada durante a injeção eletrocínica e o tempo da injeção eletrocínica. Para a determinação de MDA total, foi feita a liberação do MDA ligado em MDA livre por um processo de hidrólise alcalina. Porém, na amostra de plasma não foi possível detectar nenhum sinal do MDA. O mesmo procedimento de hidrólise nas amostras de urina viabilizou a detecção de sinal do MDA, o qual foi confirmado com fortificação com o mesmo. A quantificação de MDA total pela implementação de uma curva de calibração por semelhança de matriz minimizou o efeito de matriz. O MDA total foi quantificado em 75 amostras de urina de indivíduos submetidos ao teste de COVID-19, sendo esses valores normalizados com creatinina urinária. Porém, as concentrações de MDA encontradas estavam muito elevadas em relação a trabalhos encontrados na literatura. Dessa forma, os seguintes estudos envolvendo tratamento de amostras poderiam ser realizados para auxiliar no entendimento dos altos valores de MDA encontrados nas amostras de urina e promover o aperfeiçoamento do método: estudo de estabilidade do MDA em urina após

hidrólise alcalina, medição do MDA total das amostras de urina pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que é o método mais utilizado para essa finalidade e extração do MDA após hidrólise alcalina com um solvente adequado, para evitar a influência de interferentes.

**Palavras-chave:** eletroforese capilar; malondialdeído; urina; plasma.

## ABSTRACT

Malondialdehyde (MDA) is the most widely used biomarker of lipid peroxidation, and the development of selective, reliable, and rapid methods for its determination in biological samples is essential. Thus, the present work aimed to develop and optimize a Capillary Zone Electrophoresis with Direct UV Detection (CZE – UV) method for the determination of the MDA biomarker in urine samples from individuals tested for COVID-19 and in plasma samples from individuals supplemented with omega-3. The electrophoretic mobility of MDA was determined for the first time, which proved to be of paramount importance for the development of the CZE – UV method. Implementing an effective mobility x pH curve and simulation in the PeakMaster<sup>®</sup> software allowed the determination of the most appropriate experimental conditions for the analysis. Thus, the optimized background electrolyte (BGE) comprised TRIS 40 mmol L<sup>-1</sup>, HCl 20 mmol L<sup>-1</sup>, and CTAB 2.5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8.0). It was verified that MDA presents good absorption in the UV region. Thus, it was monitored at 266 nm. Under these conditions, MDA was detected in approximately 1 min, so this would be the method for determining MDA in biological samples by Capillary Electrophoresis (CE) with the shortest migration time ever developed. It was not possible to detect the free MDA signal in the urine and plasma samples, even by implementing a preconcentration of the analyte using the field-amplified sample injection (FASI) technique. The Box-Behnken experimental design was applied to optimize preconcentration. The factors evaluated in this experimental design were the BGE concentration, the voltage applied during the electrokinetic injection, and the time of the electrokinetic injection. To determine total MDA, bound MDA was released into free MDA by an alkaline hydrolysis. However, no MDA signal could be detected in the plasma sample. The same hydrolysis procedure in urine samples allowed the detection of an MDA signal, which was confirmed by fortification with the same. Quantification of total MDA by implementing a matrix-matched calibration curve minimized the matrix effect. Total MDA was quantified in 75 urine samples from individuals tested for COVID-19, and these values were normalized with urinary creatinine. However, the MDA concentrations found were very high compared to studies found in the literature. Thus, the following studies involving sample treatment could be performed to help understand the high MDA values found in urine samples and promote method improvement: study of MDA stability in urine after alkaline hydrolysis, measurement of total MDA in urine samples by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, which is the most widely used method for this purpose, and extraction of MDA after alkaline hydrolysis with a suitable solvent, to avoid the influence of interferents.

**Keywords:** capillary electrophoresis; malondialdehyde; urine; plasma.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Processo de peroxidação lipídica (LP) .....	22
Figura 2 – Estrutura do MDA .....	22
Figura 3 – Estruturas de ressonância e curva de distribuição do MDA .....	23
Figura 4 – Espectro de absorção no UV do MDA .....	24
Figura 5 – Reação entre MDA e TBA gerando o produto colorido MDA(TBA) <sub>2</sub> ou MDA-TBA .....	30
Figura 6 – Representação esquemática do equipamento de CE .....	34
Figura 7 – CE com polaridade normal e EOF normal para ânions .....	37
Figura 8 – CE com EOF normal e polaridade invertida para ânions .....	38
Figura 9 – CE com EOF invertido e polaridade invertida para ânions .....	38
Figura 10 – Esquema de preparo de amostras de urina para a determinação de MDA livre ..	52
Figura 11 – Esquema de preparo de amostras de plasma para a determinação de MDA livre	52
Figura 12 – Esquema de preparo de amostras para a determinação de MDA total .....	53
Figura 13 – Espectro de absorção no UV de solução de MDA em água na concentração de 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ .....	57
Figura 14 – Curva de mobilidade efetiva ( $\mu_{\text{ef}}$ ) x pH .....	59
Figura 15 – Eletroferograma da simulação no software PeakMaster® .....	61
Figura 16 – Eletroferograma de uma solução aquosa de MDA 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ .....	63
Figura 17 – Representação esquemática da análise de MDA sob EOF invertido e polaridade invertida .....	63
Figura 18 – Eletroferogramas do MDA livre na amostra de urina e amostra de urina enriquecida com MDA 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ .....	65
Figura 19 – Eletroferogramas da solução de MDA 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com injeção hidrodinâmica e FASI .....	67
Figura 20 – Eletroferogramas obtidos pela implementação do planejamento Box Behnken. Injeção de solução padrão de MDA em água na concentração de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ....	69
Figura 21 – Eletroferogramas correspondentes ao teste de repetibilidade do ensaio A, realizado por seis injeções autênticas de solução padrão de MDA em água na concentração de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ .....	71
Figura 22 – Eletroferograma da pré-concentração da amostra de urina sob as condições do ensaio A .....	72

Figura 23 – Eletroferogramas do MDA livre na amostra de plasma e amostra de plasma enriquecida com MDA 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ .....	74
Figura 24 – Eletroferograma da pré-concentração da amostra de plasma sob as condições do ensaio A.....	75
Figura 25 – Eletroferogramas da amostra de urina submetida à hidrólise alcalina com e sem fortificação de MDA a 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ .....	76
Figura 26 – Eletroferogramas da amostra de urina submetida à hidrólise alcalina com e sem fortificação de MDA.....	77
Figura 27 – Eletroferogramas da urina sintética submetida à hidrólise alcalina .....	78
Figura 28 – Eletroferogramas da amostra de plasma submetida à hidrólise alcalina com e sem fortificação de MDA a 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ .....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Codificação dos níveis para o planejamento Box-Behnken com três fatores ( $k = 3$ ) e três níveis ( $n = 3$ ).....	44
Tabela 2 – Níveis utilizados para a implementação do planejamento Box Behnken .....	54
Tabela 3 – Condições avaliadas no planejamento Box-Behnken .....	55
Tabela 4 – Dados utilizados para o cálculo da $\mu_{OBS}$ do MDA, da $\mu_{EOF}$ e da $\mu_{EP}$ do MDA .....	59
Tabela 5 – Resposta do planejamento Box-Behnken .....	68
Tabela 6 – Valores de RSD para o teste de repetibilidade do ensaio A, realizado por seis injeções autênticas de solução padrão de MDA em água na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ...	70
Tabela 7 – Valores de área utilizados para a implementação dos modelos de regressão linear .....	81
Tabela 8 – Pressupostos avaliados para a análise de variância .....	82
Tabela 9 – Dados utilizados para a análise de variância .....	82
Tabela 10 – Resultados estatísticos para os modelos de previsão .....	83
Tabela 11 – Teste de recuperação considerando o padrão de MDA em água.....	84
Tabela 12 – RSD para o teste de repetibilidade.....	84
Tabela 13 – Resultados para os testes de validação LOD, LOQ e recuperação.....	85
Tabela 14 – Resultados para a quantificação de MDA total nas amostras de urina.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE	4-hidroxinonenal
ACN	Acetonitrila
AHAD	N-acetil-hidrazina acridona (do inglês <i>N-acetylhydrazine acridone</i> )
BGE	Eletrólito (do inglês <i>background electrolyte</i> )
CE	Eletroforese Capilar (do inglês <i>Capillary Electrophoresis</i> )
CEC	Eletrocromatografia Capilar (do inglês <i>Capillary Electrochromatography</i> )
CoV	Coronavírus (do inglês <i>Coronaviruses</i> )
COVID-19	Doença de coronavírus 2019 (do inglês <i>Coronavirus Disease 2019</i> )
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio (do inglês <i>cetyltrimethylammoniumbromide</i> )
CZE	Eletroforese Capilar de Zona (do inglês <i>capillary zone electrophoresis</i> )
DH	Dansilhidrazina
DHA	Ácido docosahexaenoico (do inglês, <i>docosahexaenoic acid</i> )
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (do inglês <i>European Food Safety Authority</i> )
EOF	Fluxo eletrosmótico (do inglês <i>electroosmotic flow</i> )
EMD	Dispersão por eletromigração (do inglês <i>electromigration dispersion</i> )
EPA	Ácido eicosapentaenoico (do inglês <i>eicosapentaenoic acid</i> )
EPIs	Equipamentos de proteção individual
FA SI	Injeção de amostra amplificada por campo (do inglês <i>field-amplified sample injection</i> )
GQAQ	Grupo de Química Analítica e Quimiometria
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )
IMC	Índice de massa corporal
LC-MS	Cromatografia líquida com detecção por espectrômetro de massas (do inglês <i>Liquid chromatography coupled to Mass Spectrometer detection</i> )
LIF	Fuorescência induzida por laser (do inglês <i>laser-induced fluorescence</i> )
LMWAs	Aldeídos de baixo peso molecular (do inglês <i>low molecular weight aldehydes</i> )

LOD	Limite de detecção (do inglês <i>limit of detection</i> )
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>limit of quantification</i> )
LP	Peroxidação lipídica (do inglês <i>lipid peroxidation</i> )
MDA	Malondialdeído
MEEKC	Cromatografia Eletrocinética de Microemulsão (do inglês <i>Microemulsion Electrokinetic Chromatography</i> )
MEKC	Cromatografia Eletrocinética Capilar Micelar (do inglês <i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i> )
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (do inglês <i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i> )
MS	Espectrometria de massas (do inglês <i>mass spectrometry</i> )
PHEIC	Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (do inglês <i>Public Health Emergency of International Concern</i> )
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados (do inglês <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
QC	Controle de Qualidade (do inglês <i>Quality Control</i> )
R	Recuperação
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i> )
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês <i>relative standard deviation</i> )
SARS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (do inglês <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i> )
SARS-CoV-2	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave-2 (do inglês <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> )
TBA	Ácido tiobarbitúrico (do inglês <i>thiobarbituric acid</i> )
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> )
TCA	Ácido tricloroacético (do inglês <i>trichloroacetic acid</i> )
TRIS	Tris (hidroximetil) amino metano
uCrn	Creatinina urinária (do inglês <i>urinary creatinine</i> )
UV	Luz ultravioleta
Vis	Visível
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i> )

## LISTA DE SÍMBOLOS

$L^\bullet$	Radical lipídico
$LOO^\bullet$	Radical peróxido lipídico
$LOOH$	Hidroperóxido lipídico
F	Fonte de alta tensão
$e_1$	Eletrodo 1
$e_2$	Eletrodo 2
D	Detector
$R_1$	Frasco reservatório 1 ( <i>vial 1</i> )
$R_2$	Frasco reservatório 2 ( <i>vial 2</i> )
C	Computador
$\vartheta_{EOF}$	Velocidade eletrosmótica
$\epsilon$	Constante dielétrica do tampão
$\zeta$	Potencial zeta
E	Campo elétrico
$\eta$	Viscosidade do tampão
$\vartheta_{EP}$	Velocidade eletroforética
$\mu_{EP}$	Mobilidade eletroforética
q	Carga do analito ionizado
r	Raio do soluto
V	Voltagem aplicada
L	Comprimento total do capilar
$\vartheta_{OBS}$	Velocidade eletroforética observada
$\mu_{OBS}$	Mobilidade eletroforética observada
$\mu_{EOF}$	Mobilidade eletrosmótica
$V_s$	Volume injetado
$r_{int}$	Raio interno do capilar
$\eta_s$	Viscosidade da amostra
$\Delta p_{inj}$	Diferença de pressão da injeção
$n_a$	Quantidade de analitos injetados
$c_a$	Concentração molar do analito
$V_{inj}$	Voltagem de injeção

$t_{inj}$	Tempo de injeção
$\mu_{ef}$	Mobilidade efetiva
$\alpha_j$	Fração molar ou função de distribuição
A	Absorbância
$\epsilon$	Absortividade molar
b	Comprimento óptico
k	Fatores
n	Níveis
N	Número de experimentos
$C_o$	Número de pontos centrais
$A_{A+P}$	Área do analito adicionada do padrão utilizado
$A_A$	Área do analito
$A_P$	Área do padrão
$S_{ruído}$	Desvio padrão da linha base (ruído)
$C_{an}$	Concentração do analito
$H_{máx}$	Altura máxima do pico do analito
$H_{mín}$	Altura mínima do pico do analito
$L_{ef}$	Comprimento efetivo do capilar
$t_{MDA}$	Tempo de migração do MDA
$W_{cal}$	$W_{calculado}$
$W_{tab}$	$W_{tabelado}$
$F_{cal}$	$F_{calculado}$
$F_{tab}$	$F_{tabelado}$

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
1.1	COVID-19 .....	25
1.2	DIABETES MELLITUS TIPO 2 E OBESIDADE .....	27
1.3	MDA LIVRE E MDA TOTAL .....	28
1.4	DETERMINAÇÃO DE MDA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	29
<b>1.4.1</b>	<b>Abordagem analítica tradicional para a determinação de MDA</b> .....	<b>29</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Outras técnicas para a determinação de MDA</b> .....	<b>30</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Amostras biológicas</b> .....	<b>32</b>
1.4.3.1	<i>Urina</i> .....	33
1.4.3.2	<i>Plasma</i> .....	33
1.5	ELETROFORESE CAPILAR (CE).....	33
<b>1.5.1</b>	<b>Injeção de amostras em CE</b> .....	<b>39</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Técnicas de pré-concentração de amostras <i>on-line</i> em CE</b> .....	<b>40</b>
<b>1.5.3</b>	<b>Curva de mobilidade efetiva (<math>\mu_{ef}</math>) x pH</b> .....	<b>41</b>
<b>1.5.4</b>	<b>Deteção UV/Vis</b> .....	<b>42</b>
1.6	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	43
<b>1.6.1</b>	<b>Planejamento Box-Behnken</b> .....	<b>44</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>46</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>47</b>
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	47
3.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	47
3.3	PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE MDA.....	48
3.4	AMOSTRAS DE URINA .....	49
3.5	AMOSTRAS DE PLASMA.....	50
3.6	TRATAMENTO DAS AMOSTRAS .....	51
<b>3.6.1</b>	<b>Procedimento de preparo das amostras de urina para a determinação de MDA livre</b> .....	<b>51</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Procedimento de preparo das amostras de plasma para a determinação de MDA livre</b> .....	<b>52</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Procedimento de preparo de amostras para a determinação de MDA total em urina e plasma</b> .....	<b>52</b>

3.7	AMOSTRA SINTÉTICA DE URINA.....	53
3.8	PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN .....	53
3.9	AVALIAÇÃO DE ALGUMAS FIGURAS DE MÉRITO .....	55
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>57</b>
4.1	ESTUDO ESPECTROFOTOMÉTRICO DO MDA .....	57
4.2	DETERMINAÇÃO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA ( $\mu_{EP}$ ) DO MDA..	58
4.3	CONSTRUÇÃO DA CURVA DE MOBILIDADE EFETIVA ( $\mu_{ef}$ ) x pH .....	59
4.4	SIMULAÇÃO NO <i>SOFTWARE</i> PeakMaster® .....	61
4.5	ESTRATÉGIAS PARA MONITORAMENTO DO MDA LIVRE EMPREGANDO CZE – UV.....	64
<b>4.5.1</b>	<b>Estratégias para monitoramento do MDA livre nas amostras de urina empregando CZE – UV.....</b>	<b>64</b>
4.5.1.1	<i>Pré-concentração do MDA livre.....</i>	66
4.5.1.1.1	Otimização da FASI.....	67
<b>4.5.2</b>	<b>Estratégias para monitoramento do MDA livre nas amostras de plasma empregando CZE – UV.....</b>	<b>72</b>
4.5.2.1	<i>Preparo de amostras para o monitoramento de MDA livre nas amostras de plasma .....</i>	73
4.5.2.2	<i>Pré-concentração do MDA livre.....</i>	74
4.6	ESTRATÉGIAS PARA MONITORAMENTO DO MDA TOTAL EMPREGANDO CZE – UV.....	75
<b>4.6.1</b>	<b>Estratégias para monitoramento do MDA total nas amostras de urina empregando CZE – UV.....</b>	<b>75</b>
4.6.1.1	<i>Preparo de amostras para o monitoramento de MDA total nas amostras de urina</i>	76
<b>4.6.2</b>	<b>Estratégias para monitoramento do MDA total nas amostras de plasma empregando CZE – UV.....</b>	<b>79</b>
4.7	QUANTIFICAÇÃO DE MDA TOTAL EM AMOSTRAS DE URINA DE INDIVÍDUOS SUBMETIDOS AO TESTE DE COVID-19.....	80
<b>4.7.1</b>	<b>Avaliação de algumas figuras de mérito .....</b>	<b>80</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Quantificação de MDA total nas amostras de urina .....</b>	<b>85</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>
	<b>APÊNDICE A – Artigos publicados durante o Doutorado .....</b>	<b>102</b>
	<b>APÊNDICE B – Artigos em escrita/submissão .....</b>	<b>105</b>

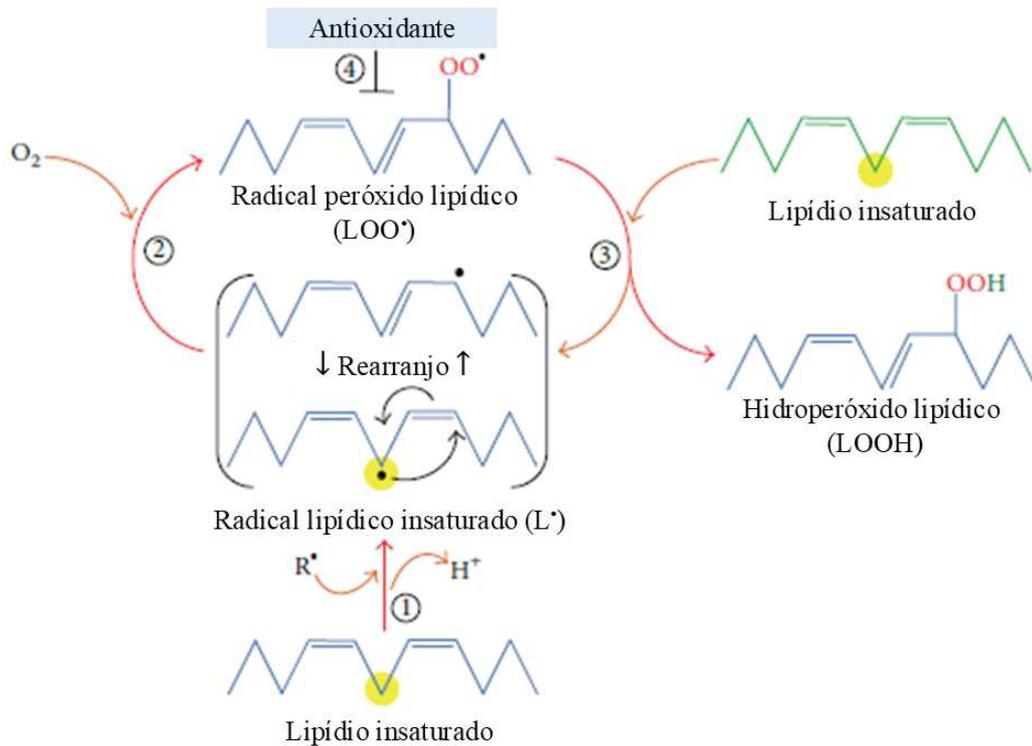
<b>APÊNDICE C – Capítulos de livros publicados .....</b>	<b>106</b>
<b>APÊNDICE D – Participação em eventos .....</b>	<b>107</b>
<b>APÊNDICE E – Participação em projetos.....</b>	<b>108</b>
<b>APÊNDICE F – Participação em bancas de trabalhos de conclusão .....</b>	<b>109</b>
<b>APÊNDICE G – Coorientação de Projeto de Iniciação Científica.....</b>	<b>110</b>
<b>APÊNDICE H – Coorientação de Trabalho de Conclusão de Curso.....</b>	<b>111</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A composição das membranas celulares inclui uma grande variedade de lipídios, que são considerados componentes essenciais dessas estruturas. Esses lipídios podem sofrer ataques, como por espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), em um processo denominado peroxidação lipídica (LP, do inglês *lipid peroxidation*). Os lipídeos mais atacados são os que apresentam ligações duplas entre carbonos nas bicamadas lipídicas das membranas celulares, sendo que os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs, do inglês *polyunsaturated fatty acids*) são os principais alvos das ROS (Ayala; Muñoz; Argüelles, 2014; Yin; Xu; Porter, 2011). A LP tem sido associada a doenças como “aterosclerose, câncer, diabetes, exposição crônica ao álcool, lesão pulmonar aguda e distúrbios neurodegenerativos, incluindo Alzheimer e Parkinson” (Mas-Bargues *et al.*, 2021).

O processo de LP se divide em iniciação, propagação e terminação, conforme mostrado na Figura 1. Durante a iniciação, há a abstração do hidrogênio alílico do lipídio por espécies prooxidantes, formando um radical lipídico ( $L^{\bullet}$ ), que é estabilizado por ressonância (1). Na propagação, o  $O_2$  ataca o  $L^{\bullet}$ , gerando um radical peróxido lipídico ( $LOO^{\bullet}$ ) (2). O  $LOO^{\bullet}$  abstrai um hidrogênio de outro lipídio levando a formação de um  $L^{\bullet}$  e hidroperóxido lipídico (LOOH) (3). Já na terminação, produtos não radicais são formados por meio de antioxidantes (4). Dessa forma, a LP resulta em vários produtos, com o LOOH atuando como o principal produto primário. Os produtos secundários incluem malondialdeído (MDA), propanal e 4-hidroxinonenal (4-HNE), sendo que o MDA tem sido o biomarcador mais utilizado para a LP. A principal fonte do MDA em amostras biológicas é a peroxidação de PUFAs ômega 3 como o ácido linolênico e de PUFAs ômega 6 como o ácido araquidônico e o ácido linoleico (Ayala; Muñoz; Argüelles, 2014; Del Rio; Stewart; Pellegrini, 2005; Grotto *et al.*, 2009; Tsikas, 2017; Zinellu *et al.*, 2011a).

Figura 1 – Processo de peroxidação lipídica (LP)



Fonte: Adaptado de Ayala; Muñoz; Argüelles (2014).

O MDA (Figura 2) é um aldeído com fórmula molecular  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$  e massa molar  $72,06 \text{ g mol}^{-1}$  (Georgakopoulos *et al.*, 2010; Korizis *et al.*, 2001; Tsikas, 2017).

Figura 2 – Estrutura do MDA

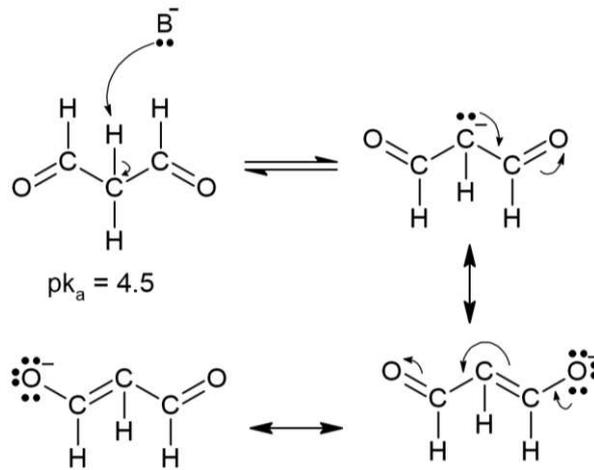


Fonte: Do Nascimento *et al.* (2023).

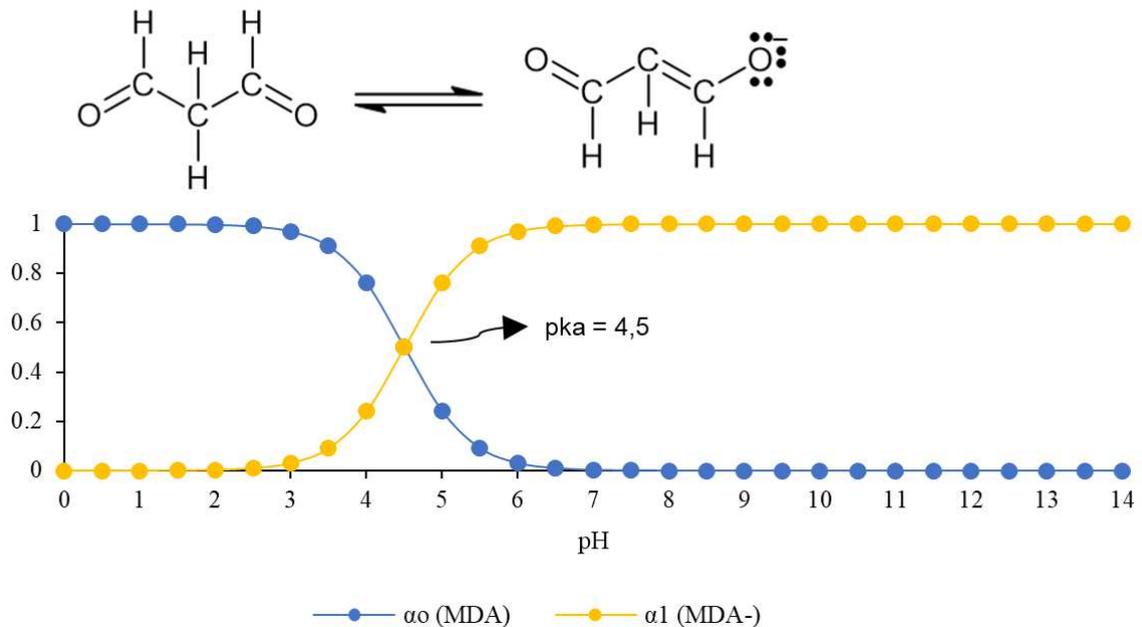
O  $\text{pK}_a$  do MDA é de cerca de 4,5, então, em pH acima desse valor, ele existe predominantemente como um ânion enolato estabilizado por ressonância. A Figura 3a mostra as três estruturas de ressonância do MDA. A Figura 3b mostra a curva de distribuição do MDA, na qual é possível visualizar que em pH acima de 4,5, a espécie predominante é o enolato (Esterbauer; Schaur; Zollner, 1991; Georgakopoulos *et al.*, 2010; Korizis *et al.*, 2001; Solomons; Fryhle; Snyder, 2023; Tsikas, 2017).

Figura 3 – Estruturas de ressonância e curva de distribuição do MDA

a – Estruturas de ressonância do MDA



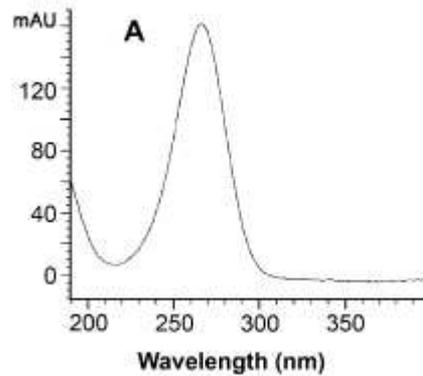
b – Curva de distribuição do MDA



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Na Figura 4 é apresentado o espectro de absorção no UV do MDA. O comprimento de onda de máxima absorção do MDA é 267 nm em condições neutras ou alcalinas e 245 nm em condições ácidas. De forma que o meio pode alterar o comprimento de onda em que a absorvância do MDA é máxima. Como o MDA apresenta absorção no UV, a sua medida tem sido realizada por técnicas espectrofotométricas ou cromatográficas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*) (Esterbauer; Schaur; Zollner, 1991; Georgakopoulos *et al.*, 2010; Tsikas, 2017).

Figura 4 – Espectro de absorção no UV do MDA



Fonte: Adaptado de Georgakopoulos *et al.* (2010).

O MDA é um indicador essencial para avaliar estados patológicos, pois indivíduos acometidos por diversas doenças apresentam níveis aumentados de MDA, como câncer, diabetes e doença de Alzheimer. Em comparação com pessoas saudáveis, as concentrações plasmáticas de MDA têm sido maiores em pessoas com diabetes, hipertensão e inflamação crônica, por exemplo. Os níveis urinários de MDA aumentaram em condições como infecção do trato urinário e nefropatia diabética. O desenvolvimento de métodos confiáveis, seletivos e rápidos capazes de quantificar o MDA como biomarcador da LP torna-se necessário para que estudos determinem a concentração de MDA em diferentes fluidos biológicos. Além da importância do MDA na avaliação de doenças, alguns estudos avaliam sua significância quanto aos efeitos toxicológicos da exposição a substâncias como poluentes (metais, solventes, entre outros) em humanos e animais (Grotto *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2023; Toto *et al.*, 2022).

O MDA também é importante no setor alimentício, pois a deterioração de alimentos que contêm gordura, principalmente PUFAs, como peixes, carnes e óleo, é causada principalmente pela LP de PUFAs. Hidroperóxidos são formados como produtos primários, e MDA e 4-HNE, entre outros, são formados como produtos secundários. O processo de LP pode ocorrer durante o armazenamento e o processamento do alimento, gerando os produtos de LP que podem afetar o sabor e a qualidade nutricional (Custodio-Mendoza *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2021; Papastergiadis *et al.*, 2012; Tsikas, 2017).

A formação de MDA em alimentos tem causado preocupação porque é considerado citotóxico, neurotóxico e mutagênico devido à sua reatividade com moléculas como DNA, proteínas e fosfolípidios. Sua alta reatividade se deve à sua eletrofilicidade, por isso é muito reativo em relação a nucleófilos como aminoácidos. De acordo com Ma e colaboradores (2021), não havia limites oficiais para o MDA até 2021; no entanto, “o Comitê Científico da Autoridade

Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, do inglês *European Food Safety Authority*) sugeriu um nível de exposição a MDA de  $30 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ , em termos do limite de preocupação toxicológica” (MA *et al.*, 2021). Assim, definir um limite para o conteúdo de MDA pode auxiliar no acesso a informações de toxicidade e pode ser usado para o controle de qualidade de alimentos e outras matrizes de interesse (Custodio-mendoza *et al.*, 2019; Giera; Lingeman; Niessen, 2012; Ma *et al.*, 2021; Papastergiadis *et al.*, 2012; Tsikas, 2017).

Além disso, a formação de MDA durante o armazenamento e o processamento de alimentos também pode ser investigada. Essa formação pode ser estudada em condições controladas, avaliando também a influência da matriz alimentar nesse processo e até mesmo o mecanismo de migração de MDA em diferentes alimentos. Nesse sentido, Ma e colaboradores (2021) investigaram a formação de MDA durante a fritura de batatas fritas e carne de peito de frango em óleos vegetais à  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  por 7h, utilizando a técnica de HPLC para quantificar o MDA. Este estudo indicou que o teor de MDA em óleos nos quais ocorreu fritura é menor do que em óleos aquecidos sem fritar nenhum alimento devido à incorporação de MDA ao alimento. Além disso, a matriz alimentar influencia no teor de MDA e no mecanismo de migração desse analito. Portanto, esses resultados demonstram a importância das avaliações sobre a formação de MDA em alimentos para garantir a segurança de alimentos (Ma *et al.*, 2021).

Assim, métodos que determinem MDA podem auxiliar agências reguladoras em pesquisas que busquem definir seu limite em matrizes alimentares, ambientais e toxicológicas (Do Nascimento *et al.*, 2023).

Além da importância do MDA em tais matrizes, estudos tem associado doenças como a doença de coronavírus 2019 (COVID-19, do inglês *Coronavirus Disease 2019*), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e obesidade ao estresse oxidativo, pela determinação de biomarcadores como o MDA. O estresse oxidativo consiste em um desequilíbrio entre as ROS e o sistema antioxidante, com as ROS excedendo a capacidade antioxidante. Esse processo pode se originar do aumento na geração de ROS, da depressão do sistema antioxidante ou ambos (Marseglia *et al.*, 2015; Oguntibeju, 2019; Roberts; Sindhu, 2009; Slatter; Bolton; Bailey, 2000; Srikanthan *et al.*, 2016).

## 1.1 COVID-19

Os coronavírus (CoV, do inglês *Coronaviruses*) pertencem à família *Coronaviridae* e são patógenos comuns de humanos e animais, podendo causar uma variedade de doenças em

animais e humanos, entre elas enfermidades respiratórias, entéricas e neurológicas (Vargas *et al.*, 2020).

Nas últimas duas décadas, três CoV zoonóticos infectaram humanos, Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*), Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV, do inglês *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) e a mais recente Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave-2 (SARS-CoV-2, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) (Lamers; Haagmans, 2022).

O SARS-CoV surgiu em novembro de 2002 na cidade de Foshan, província de Guangdong, China, resultando em 8096 casos notificados, 774 mortes relacionadas, e se espalhando por muitos países. Desde janeiro de 2004, nenhum caso dessa doença em humanos foi reportado (Azhar *et al.*, 2023; Cherry; Krogstad, 2004; Lamers; Haagmans, 2022; Rosa; Simioni; Damiano, 2022; Xu *et al.*, 2004).

O MERS-CoV foi descrito pela primeira vez em setembro de 2012, com a maioria dos casos sendo reportada em países do Oriente Médio. De abril de 2012 até maio de 2024, 2613 casos de MERS-CoV foram reportados com 943 mortes. A maioria dos casos foi reportada na Arábia Saudita (Omrani; Al-Tawfiq; Memish, 2015; WHO, 2024c).

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo SARS-CoV-2. Relatada pela primeira vez em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, capital da província de Hubei, China, a COVID-19 foi designada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (PHEIC, do inglês *Public Health Emergency of International Concern*) em 30 de janeiro de 2020 e como uma pandemia em 11 de março de 2020 (Sarker *et al.*, 2023; Vargas *et al.*, 2020; WHO, 2025).

A COVID-19 tem aproximadamente 777 milhões de casos confirmados em todo o mundo e aproximadamente 7,1 milhões de mortes (dados de 29 de dezembro de 2024). Embora a COVID-19 não seja mais considerada uma PHEIC pela WHO desde 5 de maio de 2023, casos desta doença ainda estão sendo relatados em todo o mundo (Sarker *et al.*, 2023; Vargas *et al.*, 2020; WHO, 2024a, 2025).

Estudos tem sugerido uma associação entre o estresse oxidativo e a COVID-19. Alguns pesquisadores acreditam que o desequilíbrio entre o estresse oxidativo e o status antioxidante seja uma das fisiopatologias da infecção causada pelo SARS-CoV-2 (Avila-Nava *et al.*, 2022; Do Nascimento *et al.*, 2023; Mehri *et al.*, 2021; Roberts; Sindhu, 2009; Smail; Babaei; Amin, 2023).

Os efeitos do estresse oxidativo sobre a COVID-19 podem ser mensurados pela medida de biomarcadores como o MDA. De fato, Mehri e colaboradores (2021), Avila-Nava e colaboradores (2022) e Smail e colaboradores (2023) encontraram concentrações significativamente elevadas de MDA no soro de indivíduos com COVID-19 (Avila-Nava *et al.*, 2022; Do Nascimento *et al.*, 2023; Mehri *et al.*, 2021; Smail; Babaei; Amin, 2023).

Dada a importância da elucidação do papel do estresse oxidativo sobre a COVID-19, o desenvolvimento de métodos confiáveis, seletivos e rápidos para a determinação de biomarcadores, como o MDA, em amostras biológicas é crucial (Avila-Nava *et al.*, 2022).

## 1.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2 E OBESIDADE

O DM2 e a obesidade são duas doenças que tem aumentado muito nos últimos anos, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Em 2021, cerca de 537 milhões de adultos de 20 a 79 anos apresentavam diabetes. Previsões indicam que até 2045, esse número atinja 783 milhões de pessoas. Mais de 90% dos indivíduos acometidos com diabetes convivem com o DM2, impulsionado por fatores como urbanização, diminuição de atividade física e crescimento de sobrepeso e obesidade. Em 2022, 2,5 bilhões de adultos de 18 anos ou mais se encontravam acima do peso, sendo 890 milhões com obesidade. Entre crianças e adolescentes (5 a 19 anos), o sobrepeso atingia 390 milhões (190 milhões com obesidade) (IDF, 2021; IDF Diabetes Atlas, 2021; Serván, 2013; Verma; Hussain, 2017; WHO, 2024b).

Níveis elevados de glicose no sangue são uma característica do DM2, e isso é resultado da resistência à insulina e deficiência relativa da mesma. Já a obesidade é definida pela WHO “como o acúmulo excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde e é diagnosticada com índice de massa corporal (IMC)  $\geq 30 \text{ kg m}^{-2}$ ” (Blüher, 2019; Ginter; Simko, 2013).

A resistência à insulina é o fator que liga a obesidade e o DM2, levando os indivíduos a um estado inflamatório. Ela é causada por fatores genéticos, alimentação, obesidade e sedentarismo (Serván, 2013).

Estudos tem mostrado uma relação entre essas doenças e o estresse oxidativo por meio da medição de biomarcadores. Dessa forma, tem sido evidenciada a elevada concentração de MDA em condições marcadas por DM2 e obesidade, o que corrobora com a necessidade de desenvolvimento de métodos rápidos, seletivos e confiáveis para a determinação de biomarcadores de estresse oxidativo, como o MDA, em amostras biológicas. Isso auxiliaria no monitoramento dessas doenças e no desenvolvimento de pesquisas que objetivassem o seu

controle (Marseglia *et al.*, 2015; Oguntibeju, 2019; Slatter; Bolton; Bailey, 2000; Srikanthan *et al.*, 2016).

Para isso, é crucial o entendimento da forma como o MDA é encontrado em tais amostras. Assim, sabendo que o MDA existe em materiais biológicos nas formas livre e ligado, o MDA pode ser determinado como MDA livre ou MDA total.

### 1.3 MDA LIVRE E MDA TOTAL

O MDA ligado está covalentemente ligado aos grupos SH e NH<sub>2</sub> de moléculas como proteínas ou ácidos nucleicos. Enquanto o MDA livre não está ligado a tais compostos. Essa diferenciação implica na maneira como o MDA será determinado, de forma que ele pode ser medido como MDA livre ou como MDA total, que é a soma do MDA livre e do MDA ligado (Biondi *et al.*, 2019; Cui *et al.*, 2018; De Vecchi *et al.*, 2009; Del Rio; Stewart; Pellegrini, 2005; Draper; Hadley, 1990; Giera; Lingeman; Niessen, 2012; Paroni; Fermo; Cighetti, 2002).

O MDA pode ser gerado enzimaticamente ou não enzimaticamente. Enzimaticamente, ele é gerado “como um subproduto da reação da ciclooxygenase na biossíntese de tromboxano e prostaglandina” (Jové *et al.*, 2020). Não enzimaticamente, o MDA é um produto secundário da LP e com nucleófilos como proteínas e ácidos nucleicos “pode gerar uma diversidade de adutos e ligações cruzadas intra e intermoleculares” (Jové *et al.*, 2020).

A maior parte do MDA circulante está ligado a moléculas, com uma pequena quantidade de MDA livre presente em amostras biológicas. O MDA livre é um índice de dano recente, enquanto o MDA ligado é um marcador de uma lesão mais antiga. Além disso, é importante relatar se o MDA está sendo medido como MDA livre ou total, porque é necessário liberar a fração ligada em MDA livre durante o tratamento da amostra para detectá-lo. O MDA ligado pode ser liberado por hidrólise ácida ou básica em altas temperaturas, e é vital controlar essas condições. Por outro lado, o MDA livre pode ser detectado sem qualquer tratamento hidrolítico da amostra, exigindo apenas a precipitação de proteínas com solventes orgânicos ou mesmo evitando o pré-tratamento da amostra (Biondi *et al.*, 2019; Cui *et al.*, 2018; De Vecchi *et al.*, 2009; Del Rio; Stewart; Pellegrini, 2005; Draper; Hadley, 1990; Giera; Lingeman; Niessen, 2012; Mas-Bargues *et al.*, 2021).

Para determinar o MDA total, uma etapa de hidrólise é necessária para liberar o MDA. Paroni e colaboradores (2002), por exemplo, determinaram o MDA livre e total em microsomas de fígado de rato e plasma. Para a determinação do MDA total, a hidrólise do MDA foi realizada por 1h a 60 °C na presença de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>. O MDA não é liberado de

biomoléculas da matriz em métodos que apenas precipitam proteínas, seja com solventes orgânicos ou um dispositivo para essa finalidade. Assim, o MDA é determinado na forma livre (Claeson; Aberg; Karlberg, 2000; Paroni; Fermo; Cighetti, 2002).

A derivatização de MDA com ácido tiobarbitúrico (TBA, do inglês *thiobarbituric acid*), realizada durante a preparação da amostra, requer aquecimento e um meio ácido, afetando a detecção de MDA porque o ácido libera o MDA ligado, permitindo a análise do MDA total. Portanto, a derivatização de MDA com TBA também é considerada uma hidrólise ácida da amostra, de modo que a hidrólise ocorre durante a etapa de derivatização. Por outro lado, em estudos que envolvem hidrólise básica, ou seja, usando uma base, esse tratamento é considerado uma etapa adicional na preparação da amostra (Domijan *et al.*, 2015).

Vários métodos tem sido desenvolvidos para a determinação de MDA livre ou total em diferentes matrizes biológicas, como plasma e urina.

#### 1.4 DETERMINAÇÃO DE MDA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O método mais amplamente utilizado para a determinação de MDA é o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*). Porém, encontram-se na literatura artigos que objetivam o desenvolvimento de métodos para a determinação de MDA em amostras biológicas usando-se técnicas cromatográficas.

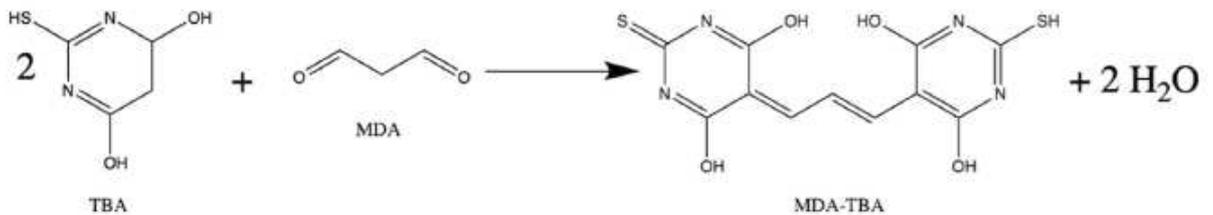
##### 1.4.1 Abordagem analítica tradicional para a determinação de MDA

A maioria das abordagens analíticas para determinar MDA envolve alguma forma de derivatização devido à sua alta reatividade em relação à nucleófilos. O TBARS, que é a abordagem mais utilizada para determinar MDA em amostras biológicas, se baseia justamente na derivatização para a análise do MDA (Antolovich *et al.*, 2002; Claeson; Aberg; Karlberg, 2000; Cooley; Lunte, 2011; Giera; Lingeman; Niessen, 2012; Grotto *et al.*, 2007; Kartavenka *et al.*, 2020; Korizis *et al.*, 2001).

O TBARS consiste na reação de MDA com TBA em uma proporção de 1:2 (MDA:TBA) em meio ácido e alta temperatura (cerca de 100 °C). A reação forma o complexo colorido (vermelho)  $\text{MDA}(\text{TBA})_2$  (também representado como MDA-TBA em alguns trabalhos), conforme mostrado na Figura 5. Métodos espectrofotométricos ou fluorométricos podem ser usados para determinar este produto. No primeiro método, a absorção ocorre na faixa

de 532 a 535 nm e, no segundo, há excitação em 532 nm e emissão em 553 nm (Antolovich *et al.*, 2002; Claeson; Aberg; Karlberg, 2000; Cooley; Lunte, 2011; Giera; Lingeman; Niessen, 2012; Grotto *et al.*, 2007; Kartavenka *et al.*, 2020; Korizis *et al.*, 2001).

Figura 5 – Reação entre MDA e TBA gerando o produto colorido MDA(TBA)<sub>2</sub> ou MDA-TBA



Fonte: Adaptado de Jitcă *et al.* (2021).

Apesar de ser um método simples, o ensaio TBARS não é específico. Isso ocorre porque várias substâncias além do MDA, como aminoácidos, proteínas, fosfolipídios e aldeídos de baixa massa molar (LMWAs, do inglês *low molecular weight aldehydes*), podem reagir com o TBA levando a resultados superestimados. Essa superestimação dos resultados também pode ser causada pela possibilidade de oxidação de componentes da matriz biológica devido à alta temperatura. Ganhos em seletividade ocorreram usando técnicas de separação como HPLC, em que o produto MDA(TBA)<sub>2</sub> é separado e detectado por absorvância ou fluorescência (Antolovich *et al.*, 2002; Claeson; Aberg; Karlberg, 2000; Cooley; Lunte, 2011; Del Rio; Stewart; Pellegrini, 2005; Grotto *et al.*, 2007; Kartavenka *et al.*, 2020; Korizis *et al.*, 2001).

#### 1.4.2 Outras técnicas para a determinação de MDA

Há relatos na literatura da utilização de outras técnicas como HPLC para a determinação de MDA em amostras biológicas, sendo que alguns métodos se baseiam em derivatização. Diferentes derivatizantes são encontrados na literatura, como o TBA (já usado no ensaio TBARS), N-acetil-hidrazina acridona (AHAD, do inglês *N-acetylhydrazine acridone*) e dansilhidrazina (DH) (Del Rio; Stewart; Pellegrini, 2005; Do Nascimento *et al.*, 2023; Dong; Tang; Chen, 2020; Giera; Lingeman; Niessen, 2012; Grotto *et al.*, 2007; Kartavenka *et al.*, 2020; Valenzuela, 1991).

Grotto e colaboradores (2007) desenvolveram um método baseado em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção visível (HPLC – Vis) para determinar MDA na forma do aduto MDA(TBA)<sub>2</sub> em plasma humano. A extração do aduto pode ter sido feita para

melhorar a detecção, uma vez que, em amostras com lipídios, pode haver turbidez no sobrenadante, o que dificulta a detecção espectrofotométrica (Grotto *et al.*, 2007; Kartavenka *et al.*, 2020; Valenzuela, 1991).

Dong e colaboradores (2020) desenvolveram um método para determinar MDA na próstata de ratos usando HPLC e detecção de fluorescência. Para isso, a AHAD foi usada como um reagente de derivatização fluorescente. Algumas vantagens que foram relatadas da AHAD sobre a TBA são a menor temperatura de derivatização e maior rapidez (Dong; Tang; Chen, 2020).

O reagente derivatizante DH foi utilizado em um método por cromatografia líquida com detecção por espectrômetro de massas (LC – MS, do inglês *Liquid chromatography coupled to Mass Spectrometer detection*) para a determinação de MDA em amostras de urina e soro. A derivatização se baseou na reatividade do MDA em relação a nucleófilos, produzindo um derivado hidrazona estável do MDA (MDA – DH pirazol) (Giera; Lingeman; Niessen, 2012; Kartavenka *et al.*, 2020).

Outra técnica que tem sido utilizada para determinar MDA em amostras biológicas é a Eletroforese Capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*). O artigo de revisão publicado por Do Nascimento e colaboradores (2023) mostrou que até 2023, treze artigos haviam sido publicados objetivando a determinação de MDA em diversas amostras biológicas por essa técnica. Nesses artigos, foram discutidas possibilidades para a análise desse analito em diversos tecidos e fluidos biológicos de humanos e ratos, incluindo análises de MDA livre e MDA total, com e sem a realização de derivatização, utilização de detecção por UV e fluorescência, determinação simultânea com outros analitos e estudos de preparação de amostras (Do Nascimento *et al.*, 2023).

Esses artigos mostraram que o uso da CE para a análise de MDA em amostras biológicas apresentava vantagens sobre outras técnicas, como o uso de uma pequena quantidade de amostra, um eletrólito (BGE, do inglês *background electrolyte*) aquoso, utilização de baixo volume de solvente orgânico, curto tempo de análise, alta eficiência, ausência de derivatização na etapa de preparação da amostra e separação de interferentes. Embora algumas metodologias para a determinação de MDA por CE façam a sua derivatização, a maioria dos artigos encontrados mostra que a ausência de uma etapa de derivatização é possível, o que pode reduzir o tempo de preparação da amostra. Esses fatores mostram o excelente potencial da CE para a determinação de MDA em amostras biológicas (Do Nascimento *et al.*, 2023; Paroni; Fermo; Cighetti, 2002; Wilson *et al.*, 1997; Zinellu *et al.*, 2011a, 2011b).

Apesar dos avanços alcançados pela CE na análise de MDA em amostras biológicas nos últimos anos, existem muitas possibilidades de aprimoramento dos métodos. Essas possibilidades envolvem ganhos de sensibilidade do método, aumento da frequência analítica e preparo de amostras para a determinação de MDA livre e total (Do Nascimento *et al.*, 2023).

A melhora da sensibilidade do método se relaciona à redução do limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) já que o MDA é encontrado em amostras biológicas em baixas concentrações. De fato, adultos nos Estados Unidos apresentam  $1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MDA livre e  $13,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MDA total em urina. Em plasma, são encontrados valores de referência de MDA total em indivíduos saudáveis na faixa de  $0,138$  a  $13,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Portanto, métodos que detectem MDA em baixas concentrações são necessários. A pré-concentração *on-line* é uma maneira elegante e eficiente de enriquecimento de analitos, técnica que já se mostrou viável em relatos da literatura. Assim, os fatores que afetam esse processo devem ser investigados. A Quimiometria é uma ferramenta que pode ser usada para essa investigação, pois pode analisar os fatores que influenciam significativamente no enriquecimento. Alguns fatores que podem ser estudados são os parâmetros eletrocinéticos de injeção da amostra (voltagem aplicada e tempo de aplicação da voltagem) e concentração do BGE. Já a melhora da frequência analítica pode ser alcançada pela diminuição do tempo de migração do MDA. Para isso, algumas variáveis devem ser avaliadas, como a composição do BGE, que inclui estudos sobre o tipo de tampão utilizado (mobilidade, pH e concentração, por exemplo) e uso de aditivos. A voltagem aplicada também é um fator relevante da avaliação (Antunes *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2018; Do Nascimento *et al.*, 2023).

MDA livre e total tem sido medidos por CE em diversas matrizes biológicas, como plasma e urina. Porém, até 2023, apenas um artigo havia sido publicado com o objetivo de determinar MDA em urina. Nesse trabalho, o MDA foi determinado por fluorescência, como MDA livre, após sua derivatização com fluoresceína 5-tiossemicarbazida (Baños; Silva, 2011).

### **1.4.3 Amostras biológicas**

Até o momento, o soro é o principal fluido biológico usado nos estudos de elucidação do papel do estresse oxidativo sobre a COVID-19. Porém, a urina é outro fluido biológico que pode ser avaliado para esses propósitos, tendo a vantagem de apresentar uma coleta simples e não invasiva (Moreira *et al.*, 2022, 2023).

#### 1.4.3.1 *Urina*

A urina é um fluido biológico que pode ser avaliado para monitorar MDA. De fato, estudos têm mostrado níveis elevados desse biomarcador em condições de infecção do trato urinário (Do Nascimento *et al.*, 2023; Moreira *et al.*, 2022; Toto *et al.*, 2022).

A urina “é um fluido transparente, estéril e de cor âmbar gerado pelos rins” (Bouatra *et al.*, 2013) de mamíferos. É o produto da extração dos resíduos solúveis da corrente sanguínea pelos rins, além do excesso de água e diversos compostos. Dessa forma, a urina é composta por ureia, sais inorgânicos, creatinina, amônia, ácidos orgânicos, toxinas solúveis em água, entre outros (Bouatra *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2023).

#### 1.4.3.2 *Plasma*

O plasma é um líquido amarelo claro obtido do sangue total após centrifugação com um anticoagulante. Na centrifugação, a porção celular do sangue total composta pelos eritrócitos (hemácias), leucócitos e trombócitos (plaquetas) são decantadas. O soro se diferencia do plasma pela coagulação do sangue total sem anticoagulante, sendo centrifugado só após essa coagulação, de forma que o soro é o plasma sem o fibrinogênio (De Oliveira Moreira *et al.*, 2023; Labarinas; Arni; Karam, 2013; NBME, 2024).

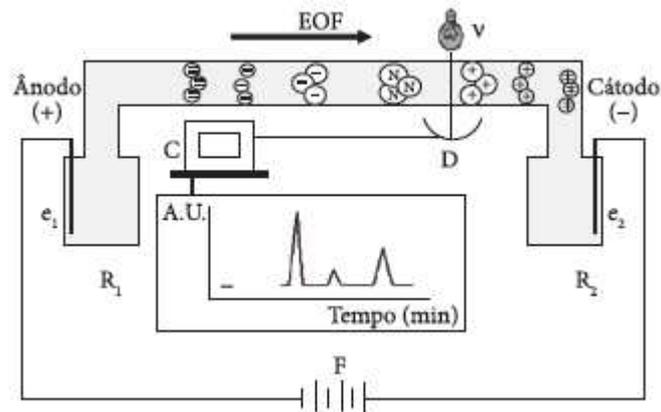
O plasma é constituído por 91 a 92% de água, proteínas como albumina, globulina, imunoglobulinas e fibrinogênio, eletrólitos como sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto, bicarbonato e glicose, creatinina, ácido úrico, hormônios, enzimas, vitaminas, lipídeos, carboidratos e aminoácidos, entre outras pequenas moléculas orgânicas suspensas ou dissolvidas nele (De Oliveira Moreira *et al.*, 2023; Labarinas; Arni; Karam, 2013; NBME, 2024).

### 1.5 ELETROFORESE CAPILAR (CE)

A CE é uma técnica de separação analítica que se baseia na migração diferenciada de compostos neutros, espécies ionizáveis e íons solvatados mediante a aplicação de um campo elétrico à um tubo capilar contendo uma solução eletrolítica (Kitagawa; Otsuka, 2014; Oliveira *et al.*, 2012).

Uma representação esquemática do equipamento de CE é demonstrada na Figura 6.

Figura 6 – Representação esquemática do equipamento de CE



R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>: frascos reservatórios (*vials*), e<sub>1</sub> e e<sub>2</sub>: eletrodos, F: fonte de alta tensão, D: detector, C: computador para obtenção e tratamento dos dados, EOF: fluxo eletrosmótico  
 Fonte: Spudeit; Dolzan; Micke (2012).

O instrumento consiste, basicamente, em um tubo capilar onde a separação ocorre, uma fonte de alta tensão (F, que opera com voltagens de até  $\pm 30$  kV), um par de eletrodos (e<sub>1</sub> e e<sub>2</sub>) (geralmente, de platina), um detector (D), frascos reservatórios (*vials*) de amostra e BGE (R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>) e um computador (C) para obtenção e tratamento de dados (Baker, 1995; Spudeit; Dolzan; Micke, 2012).

Entre os vários modos de CE disponíveis, um dos mais utilizados consiste na Eletroforese Capilar de Zona (CZE, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*), também conhecida como eletroforese capilar em solução livre, porém este é o termo menos utilizado (Baker, 1995; Tavares, 1997).

A CZE possibilita a separação de íons e compostos ionizáveis. Para isso, um tubo capilar é preenchido com um BGE, geralmente de composição constante e características tamponantes. Quando a amostra é injetada e uma tensão constante é aplicada, os solutos migram através do capilar em zonas com velocidades constantes, mas que são distintas por causa das suas mobilidades eletroforéticas, o que gera a separação dos analitos (Baker, 1995; Tavares, 1997).

Os tubos capilares mais usados em CE são os de sílica fundida. Esses capilares possuem grupos silanol (Si – OH) que são ionizados a grupos silanoato (Si – O<sup>-</sup>), em pH em torno de 3,0, quando o BGE é inserido no capilar. Geralmente, uma solução básica como o hidróxido de sódio (NaOH) é inserida no capilar para melhorar a ionização (Baker, 1995).

Após a lavagem do capilar com base forte para melhorar a sua ionização, o BGE é inserido no capilar. Com isso, a superfície interna do capilar que está carregada negativamente atrai os cátions do BGE, formando uma camada interna de cátions que é denominada como

camada fixa. Essa camada fixa não possui carga positiva suficiente para neutralizar as cargas negativas da superfície interna do capilar. Por isso, uma segunda camada de cátions, a camada móvel, se forma nas proximidades da camada fixa. As duas camadas em conjunto recebem o nome de dupla camada difusa (Baker, 1995).

Quando a voltagem é aplicada, os cátions da camada móvel são atraídos em direção ao catodo (polo negativo). Como esses cátions são solvatados, o BGE é arrastado com eles, causando o fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *electroosmotic flow*), que tem uma velocidade que é chamada de velocidade eletrosmótica ( $\vartheta_{\text{EOF}}$ ), dada pela Equação (1). De forma que o EOF é direcionado do polo positivo (anodo) para o polo negativo (catodo). Esse processo é conhecido como EOF normal (Baker, 1995).

$$\vartheta_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon\zeta E}{4\pi\eta} \text{ (Equação 1)}$$

Na Equação (1),  $\varepsilon$  é a constante dielétrica do tampão,  $\zeta$  é o potencial zeta,  $E$  é o campo elétrico aplicado e  $\eta$  corresponde a viscosidade do BGE. Sendo que o  $\zeta$  é determinado pela carga na superfície do capilar e é proporcional a espessura da dupla camada difusa (Baker, 1995).

É possível realizar a inversão do EOF. Uma maneira de realizar essa inversão é pela adição de um surfactante catiônico ao BGE. Os surfactantes mais utilizados são os derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa, como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, do inglês *cetiltrimethylammoniumbromide*). Nessa condição, enquanto a cauda hidrofóbica da amina quaternária interage entre si, a cauda hidrofílica carregada positivamente interage com os grupos silanoato da superfície interna do capilar e com os ânions do BGE. Quando a voltagem é aplicada, essa camada negativa que está nas proximidades da superfície interna do capilar é atraída pelo anodo (polo positivo). E como esses ânions são solvatados, o BGE é conduzido com as espécies negativamente carregadas, causando o EOF. Como o EOF é direcionado do polo negativo (catodo) para o positivo (anodo), ele é chamado de EOF invertido, sendo muito usado para diminuir o tempo de migração de analitos (Baker, 1995; Colombara; Tavares; Massaro, 1997; Tavares, 1997).

Ao aplicar uma tensão constante, os analitos carregados migrarão através do capilar com uma velocidade, característica e distinta para cada um, que é chamada de velocidade eletroforética ( $\vartheta_{\text{EP}}$ ), dada pela Equação (2), que é dependente da mobilidade eletroforética ( $\mu_{\text{EP}}$ ) e do  $E$  (Baker, 1995).

$$\vartheta_{EP} = \mu_{EP} E \text{ (Equação 2)}$$

A  $\mu_{EP}$  é a mobilidade característica de cada íon em solução e é dada pela Equação (3), em que,  $q$  é a carga do analito ionizado e  $r$ , o raio do soluto, que é assumido como radial. Dessa forma, tem-se que quanto maior a razão carga/raio ( $\frac{q}{r}$ ) do íon, maior a  $\mu_{EP}$  para um dado  $E$  e BGE usado, o que resulta em maior velocidade (Baker, 1995):

$$\mu_{EP} = \frac{q}{6\pi\eta r} \text{ (Equação 3)}$$

A  $\mu_{EP}$  também pode ser expressa em função do  $E$ , pela Equação (4), em que o  $E$  é definido como a razão entre a voltagem aplicada ( $V$ ) e o comprimento total do capilar ( $L$ ) (Baker, 1995).

$$\mu_{EP} = \frac{\vartheta_{EP}}{E} = \frac{\vartheta_{EP} L}{V} \text{ (Equação 4)}$$

A separação das espécies ocorre devido a diferença da  $\vartheta_{EP}$  entre elas (Baker, 1995; Spudeit; Dolzan; Micke, 2012).

A velocidade do analito no sistema eletroforético, chamada de velocidade eletroforética observada ( $\vartheta_{OBS}$ ) depende tanto da  $\vartheta_{EOF}$  quanto da  $\vartheta_{EP}$  e é dada pela Equação (5) (Baker, 1995).

$$\vartheta_{OBS} = \vartheta_{EP} + \vartheta_{EOF} \text{ (Equação 5)}$$

A mobilidade eletroforética observada ( $\mu_{OBS}$ ) também é influenciada pela mobilidade eletrosmótica ( $\mu_{EOF}$ ) e  $\mu_{EP}$  pela Equação (6) (Baker, 1995):

$$\mu_{OBS} = \mu_{EP} + \mu_{EOF} \text{ (Equação 6)}$$

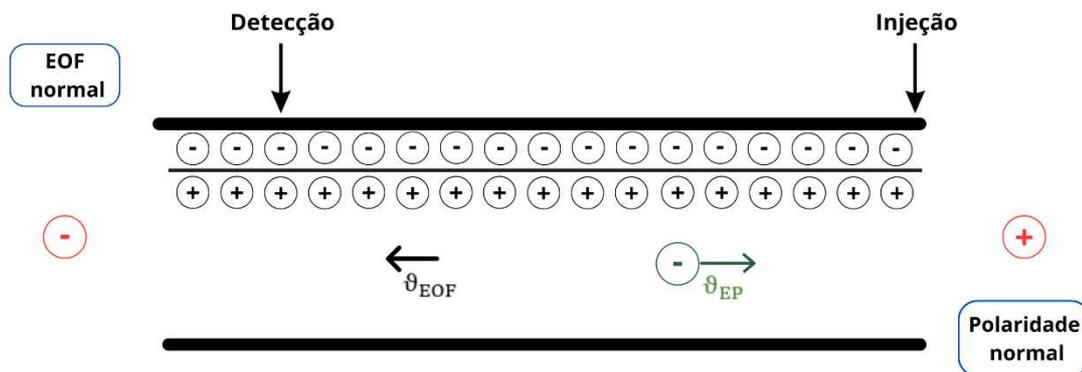
O equipamento de CE possibilita o uso de voltagem tanto positiva quanto negativa. Assim, o controle do EOF e da polaridade da fonte de alta tensão é importante para a análise de ânions (Tavares, 1997).

Se a polaridade da fonte de alta tensão é positiva na extremidade do capilar em que é feita a introdução da amostra, a polaridade é chamada de normal. Mas se a polaridade é negativa

na extremidade do capilar em que é introduzida a amostra, a polaridade é chamada de invertida (Baker, 1995; Colombara; Tavares; Massaro, 1997; Tavares, 1997).

Na análise de ânions sob EOF normal (EOF direcionado ao catodo (-)) e polaridade normal (positiva na extremidade em que é feita a introdução da amostra), como os ânions são atraídos pelo anodo (polo positivo) assim como a sua  $\mu_{EP}$ , há o movimento na direção oposta ao EOF, conforme mostra a Figura 7. Assim, passam pelo detector os ânions maiores, já que são arrastados pelo EOF por serem mais lentos e apresentarem mobilidade menor do que o EOF. Se os ânions forem rápidos ou moderadamente lentos, eles deixam a coluna assim que o campo elétrico é aplicado e não atingem o detector (Baker, 1995; Colombara; Tavares; Massaro, 1997; Tavares, 1997).

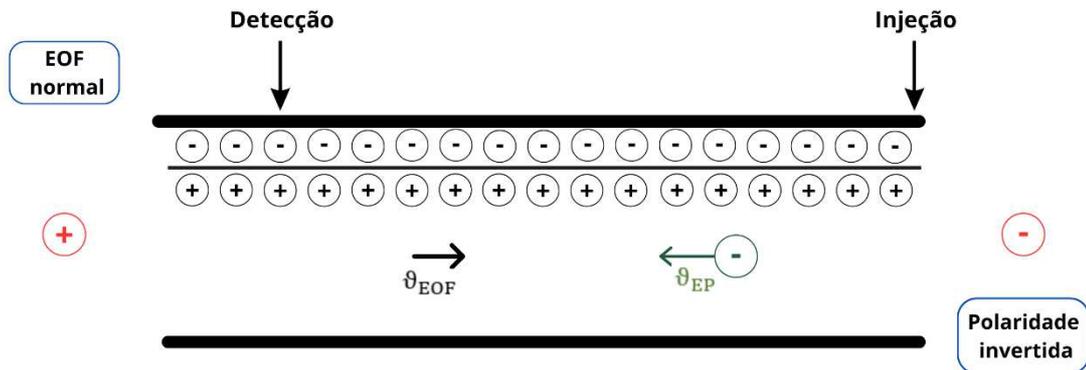
Figura 7 – CE com polaridade normal e EOF normal para ânions



$v_{EOF}$ : velocidade eletrosmótica,  $v_{EP}$ : velocidade eletroforética  
 Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Dessa forma, para a análise de ânions rápidos, é interessante a inversão da polaridade da fonte de alta tensão. Assim, o detector fica posicionado do lado positivo (anodo), exercendo atração sobre os ânions, enquanto o EOF continua direcionado ao catodo (polo negativo), conforme a Figura 8. Os ânions continuam migrando na direção oposta ao EOF, porém como os ânions rápidos possuem mobilidade maior do que o EOF, eles conseguem ser detectados no detector. Entretanto, o fato de migrarem no fluxo contraeletrosmótico pode levar a análises com tempo maior (Baker, 1995; Colombara; Tavares; Massaro, 1997; Tavares, 1997).

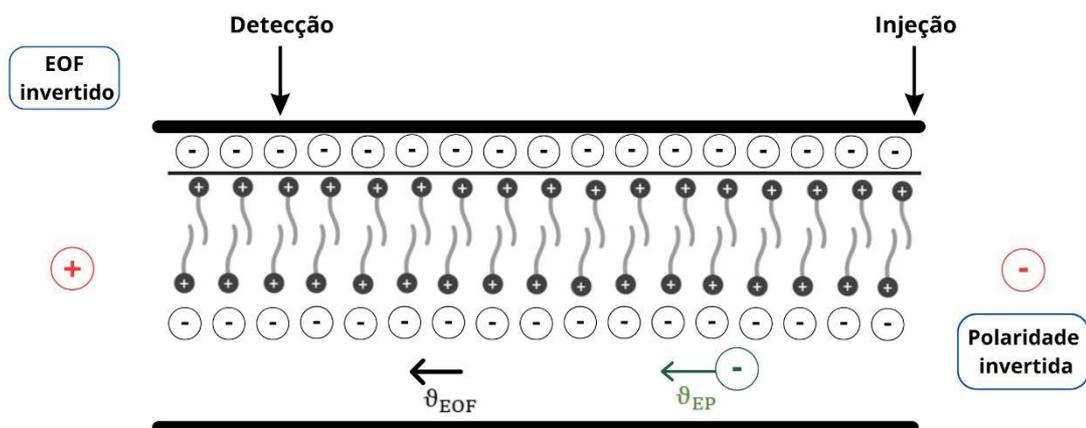
Figura 8 – CE com EOF normal e polaridade invertida para ânions



$\vartheta_{EOF}$ : velocidade eletrosmótica,  $\vartheta_{EP}$ : velocidade eletroforética  
 Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A diminuição do tempo de migração dos ânions pode ser realizada pela inversão do EOF, mantendo a polaridade invertida. Para essa inversão, pode ser adicionado um surfactante catiônico, como o CTAB, ao BGE. Nessa condição, como demonstrado na Figura 9, a cauda hidrofílica da amina quaternária carregada positivamente interage com os grupos silanoato ( $\text{Si} - \text{O}^-$ ) da parede do capilar, enquanto a cauda hidrofóbica se associa entre si. A cauda hidrofílica também interage com os ânions do BGE, que ao serem atraídos pelo polo positivo (ânodo) invertem o EOF sob a ação de um campo elétrico. Dessa forma, os ânions migrarão no fluxo coeletrosmótico, diminuindo o tempo de migração (Baker, 1995; Colombara; Tavares; Massaro, 1997; Tavares, 1997).

Figura 9 – CE com EOF invertido e polaridade invertida para ânions



$\vartheta_{EOF}$ : velocidade eletrosmótica,  $\vartheta_{EP}$ : velocidade eletroforética  
 Fonte: Elaborado pela autora (2025).

### 1.5.1 Injeção de amostras em CE

A injeção de amostras no capilar pode ocorrer de duas formas, por injeção hidrodinâmica ou por injeção eletrocinética. Na injeção hidrodinâmica, forma mais comum de introdução de amostras, a injeção pode ser feita por pressão ou gravidade. A injeção por pressão é feita pela aplicação de pressão no reservatório de amostra, levando a uma diferença de pressão entre esse reservatório e o capilar. Na injeção por gravidade, conhecida também como sifonamento, a injeção é realizada elevando o reservatório de amostra a uma altura conhecida acima do reservatório contendo BGE, de modo que a solução de amostra entre no capilar (Baker, 1995; Krivácsy *et al.*, 1999; Spudeit; Dolzan; Micke, 2012).

A segunda forma de injeção de amostras é a eletrocinética ou por eletromigração. Nesse tipo de introdução de amostra, ela é introduzida através da aplicação de voltagem à um eletrodo imerso no reservatório contendo a amostra, produzindo um campo elétrico de forma que os componentes da amostra migram para dentro do capilar pelo EOF e  $\mu_{EP}$ . Compostos neutros são injetados por ação do EOF já que sua  $\mu_{EOF}$  é igual a zero. Apesar de não ser a forma mais comum de injeção de amostras em CE, ela vem ganhando espaço devido a sua aplicabilidade em técnicas de pré-concentração de analitos (Baker, 1995; Spudeit; Dolzan; Micke, 2012).

Na injeção hidrodinâmica, o volume injetado ( $V_s$ ) é calculado pela equação de Poiseuille Equação (7), em que  $r_{int}$  é o raio interno do capilar,  $\eta_s$  é a viscosidade da amostra e  $\Delta p_{inj}$  é a diferença de pressão da injeção (Baker, 1995; Krivácsy *et al.*, 1999).

$$V_s = \frac{\Delta p_{inj} t_{inj} r_{int}^4 \pi}{8 \eta_s L} \text{ (Equação 7)}$$

A quantidade de analitos injetados ( $n_a$ ) é obtida pela Equação (8), em que  $c_a$  é a concentração molar do analito (Krivácsy *et al.*, 1999).

$$n_a = V_s c_a = \frac{\Delta p_{inj} t_{inj} r_{int}^4 \pi c_a}{8 \eta_s L} \text{ (Equação 8)}$$

Na injeção eletrocinética,  $n_a$  é dada pela Equação (9), em que  $V_{inj}$  é a voltagem de injeção e  $t_{inj}$  é o tempo de injeção. Por essa equação, percebe-se que a  $n_a$  pode ser aumentada variando-se a  $V_{inj}$  e a  $t_{inj}$  (Krivácsy *et al.*, 1999).

$$n_a = \frac{V_{inj} t_{inj} c_a r_{int}^2 \pi (\mu_{EP} + \mu_{EOF})}{L} \text{ (Equação 9)}$$

O  $V_s$  é dado pela Equação (10).

$$V_s = \frac{V_{inj} t_{inj} \mu_{EOF} r_{int}^2 \pi}{L} \text{ (Equação 10)}$$

Comparando-se as Equações (8) e (9), ou seja, comparando-se a  $n_a$  dos dois tipos de introdução de amostras em CE, a injeção depende de parâmetros do equipamento como  $\Delta p_{inj}$ ,  $t_{inj}$  e  $V_{inj}$  e de parâmetros do capilar como  $r_{int}$  e  $L$ . A injeção eletrocínética varia ainda com a  $\mu_{EOF}$  que depende do BGE, enquanto a hidrodinâmica resulta da  $\eta_s$ . Porém, os dois tipos de introdução de amostra dependem ainda das características do analito, sendo a  $c_a$  preponderante na hidrodinâmica e a combinação entre  $c_a$  e  $\mu_{EP}$  essenciais para a eletrocínética. Isso significa que a injeção hidrodinâmica não é discriminativa para diferentes tipos de analitos. Porém, a injeção eletrocínética é discriminativa para íons, pois íons de maior  $\mu_{EP}$  são injetados em maior quantidade e íons de menor  $\mu_{EP}$  são injetados em menor teor. Além disso, a alteração da polaridade da  $V_{inj}$  (positiva ou negativa) pode favorecer cátions ou ânions, excluindo-se a injeção de um deles (Krivácsy *et al.*, 1999).

### 1.5.2 Técnicas de pré-concentração de amostras *on-line* em CE

A CE é uma técnica capaz de separar analitos em amostras complexas. Para a detecção, costumam ser empregadas técnicas de pré-concentração de amostras *on-line* e *off-line* (Kitagawa; Otsuka, 2014).

Especialmente para fluidos biológicos, as técnicas de pré-concentração *off-line* na etapa de pré-tratamento de amostra são necessárias, seja para extrair ou enriquecer os analitos. Nos últimos anos, várias técnicas de extração *off-line* incluindo extração líquido-líquido e extração em fase sólida são combinados com CE. Essas técnicas de pré-concentração e pré-tratamento das amostras, apesar de efetivas, aumentam as etapas da análise e o tempo de processamento (Kitagawa; Otsuka, 2014; Raterink *et al.*, 2014).

Em comparação com as técnicas *off-line*, as técnicas de pré-concentração de amostra *on-line* são realizadas no capilar de separação. Entre elas, a técnica de injeção de amostra amplificada por campo (FASI, do inglês *field-amplified sample injection*) fornece boa

eficiência de enriquecimento. Na FASI, os analitos são injetados no capilar eletrocineticamente, ou seja, com aplicação de voltagem. A solução da amostra tem menor condutividade em relação à solução do BGE. Como a intensidade do campo elétrico é inversamente proporcional à condutividade elétrica, o campo elétrico da zona de amostra é maior do que no BGE. Dessa forma, a migração de analitos iônicos na zona de amostra é maior do que na zona de BGE, de modo que os analitos se acumulam na interface entre a zona de amostra e a zona de BGE (Gao *et al.*, 2019; Kitagawa; Otsuka, 2014).

Com a FASI, Zinellu e colaboradores (2011) alcançaram um LOD de  $3 \text{ } \eta\text{mol L}^{-1}$  na determinação de MDA livre em plasma humano por CE – UV, de modo que houve um aumento de sensibilidade de cerca de 100 vezes em relação à injeção hidrodinâmica, permitindo detectar baixas concentrações de MDA. Assim, a FASI se mostra como uma abordagem interessante para detectar baixas concentrações de MDA (Zinellu *et al.*, 2011b).

Estudos podem ser realizados para otimizar a FASI, de modo a garantir um enriquecimento adequado. Nesse sentido, o planejamento de experimentos pode ser uma ferramenta essencial para essa otimização, podendo definir os fatores que influenciam significativamente na FASI. Os fatores mais importantes que podem ser estudados são a concentração do BGE e os parâmetros da injeção eletrocinética da amostra (tempo e voltagem aplicada). Esse planejamento pode fornecer informações valiosas sobre a influência individual de cada fator na FASI, e a relação entre esses fatores (Do Nascimento *et al.*, 2023).

### 1.5.3 Curva de mobilidade efetiva ( $\mu_{ef}$ ) x pH

Substâncias que se comportam como ácidos ou bases fracos apresentam pelo menos duas espécies em equilíbrio: uma neutra, de mobilidade zero, e outra ionizada, com uma mobilidade específica, chamada de mobilidade efetiva ( $\mu_{ef}$ ) (Spudeit; Dolzan; Micke, 2012; Tavares, 1996).

A  $\mu_{ef}$  de uma determinada espécie  $i$ , em solução, em equilíbrio com diferentes espécies  $j$ , pode ser calculada pela definição de Tiselius, que afirma que as espécies em equilíbrio irão migrar sob a influência de um campo elétrico com uma mobilidade efetiva dada pela Equação (10) (Tavares, 1996).

$$\mu_{ef_i} = \sum (\mu_{EP} \alpha_j) \text{ (Equação 10)}$$

Em que,  $\alpha_j$  representa a fração molar ou função de distribuição das espécies e  $\mu_{EP}$  a mobilidade eletroforética de cada espécie em equilíbrio (Tavares, 1996).

A função de distribuição depende da magnitude da constante de dissociação do soluto ( $pK_a$ ) e determina as espécies que predominam em um dado valor de pH. Dessa forma, possuindo os valores de  $pK_a$  é possível calcular a função de distribuição das espécies em equilíbrio, em um dado intervalo de pH (Tavares, 1996).

Construída essa função, e com o auxílio das  $\mu_{EP}$  das espécies, determina-se os valores de mobilidade efetiva das espécies em um determinado pH. Com esses valores, é possível construir uma curva de mobilidade efetiva *versus* pH.

Essa curva é um modo teórico útil para escolha do melhor pH para uma determinada separação ocorrer, auxiliando na escolha dos constituintes dos BGEs, pois ela determina o pH em que as diferenças entre as mobilidades do analito e de interferentes da matriz da amostra são maximizadas, melhorando a separação (Tavares, 1996).

#### 1.5.4 Detecção UV/Vis

Em CE, o modo de detecção mais utilizado é o baseado na absorbância da luz ultravioleta (UV) ou Vis. Ele é usado quando as espécies de interesse apresentam absorção na região do ultravioleta e/ou visível. Quando se incide luz sobre o capilar, a amostra absorve parte dessa luz e o que não é absorvido é detectada por um fotodetector, também chamado de fotodiodo (Baker, 1995; Spudeit; Dolzan; Micke, 2012).

O princípio da detecção por UV/Vis é baseada na lei de Lambert Beer, em que a absorbância (A) é dada pela Equação (11) (Baker, 1995; Sato, 2014).

$$A = \epsilon b c_a \text{ (Equação 11)}$$

Em que  $\epsilon$  é a absorvidade molar e  $b$ , o comprimento óptico. Para a CE,  $b$  será o próprio diâmetro interno do capilar. A absorvidade molar depende das características do grupo cromóforo do soluto, do comprimento de onda incidente e da composição do BGE (Baker, 1995; Sato, 2014).

Considerando esse tipo de detecção, é possível detectar o MDA no UV, sem a realização de uma etapa de derivatização. Como visto na Figura 4, o MDA apresenta absorção no UV, sendo o seu comprimento de onda de máxima absorção em 267 nm em condições neutras ou

alcalinas e 245 nm em condições ácidas (Esterbauer; Schaur; Zollner, 1991; Georgakopoulos *et al.*, 2010; Tsikas, 2017).

Alguns artigos que determinam MDA em amostras biológicas por CE realizam uma etapa de derivatização para permitir que o MDA seja detectado por fluorescência. Dessa forma, a detecção do MDA no UV em cerca de 267 nm é uma vantagem do método, pois corrobora com a sua seletividade. Além disso, evita uma etapa de derivatização, trazendo ganhos como redução do tempo de preparo de amostras e consumo de reagentes, além de diminuir a possibilidade de geração de interferentes durante a etapa de preparo de amostras (Do Nascimento *et al.*, 2023).

## 1.6 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O planejamento de experimentos tem sido utilizado, entre outros, para desenvolver métodos analíticos e melhorar a performance de análises.

O planejamento fatorial auxilia o planejamento de experimentos, fornecendo dados organizados que colabora com a interpretação e entendimento do sistema em estudo.

Para a execução de um planejamento fatorial, inicialmente é preciso definir os fatores ou variáveis de interesse, assim como as respostas. Ambos podem ser qualitativos ou quantitativos. Também é necessário identificar com clareza quais os objetivos que se pretende alcançar, já que cada objetivo pretendido necessita de um determinado planejamento (Neto; Scarminio; Bruns, 2001).

Em seguida, identifica-se os níveis em que cada fator será avaliado. O planejamento fatorial completo executa experimentos em todas as combinações possíveis dos níveis, com cada combinação correspondendo a um ensaio experimental (Neto; Scarminio; Bruns, 2001).

Um planejamento com  $k$  fatores, variando em  $n$  níveis, contará com  $n^k$  ensaios. Se, por exemplo, um determinado estudo avaliará o efeito de 3 fatores ( $k = 3$ ) sobre uma determinada resposta, variando em 2 níveis ( $n = 2$ ) em cada um, o planejamento fatorial completo realizará  $2^3$  ensaios experimentais, ou seja, 8 experimentos ao todo. Esse valor corresponde a um número mínimo de experimentos a serem realizados. Em caso de interesse em estimar o erro experimental, são necessários a repetição de experimentos, o que demanda a realização de mais ensaios (Neto; Scarminio; Bruns, 2001).

Nesse tipo de experimento, o nível inferior é indicado pelo símbolo (-), o nível intermediário tem sua indicação dada pelo símbolo (0) e o nível superior é indicado pelo símbolo (+) (Neto; Scarminio; Bruns, 2001).

### 1.6.1 Planejamento Box-Behnken

Os planejamentos Box-Behnken se baseiam em experimentos fatoriais incompletos de três níveis ( $n = 3$ ). O número de experimentos ( $N$ ) desse planejamento é dado pela Equação (12), em que  $C_o$  é o número de pontos centrais. Um planejamento com três fatores ( $k = 3$ ) e triplicata no ponto central ( $C_o = 3$ ) terá, portanto, 15 experimentos (Ferreira *et al.*, 2007).

$$N = 2k(k - 1) + C_o \text{ (Equação 12)}$$

A Tabela 1 mostra os valores codificados dos níveis para cada fator de um planejamento Box-Behnken com três fatores ( $k = 3$ ), três níveis ( $n = 3$ ) e triplicata no ponto central ( $C_o = 3$ , representado pelos Ensaios M, N e O), totalizando 15 experimentos ( $N = 15$ ).

Tabela 1 – Codificação dos níveis para o planejamento Box-Behnken com três fatores ( $k = 3$ ) e três níveis ( $n = 3$ )

Ensaio	$X_1$	$X_2$	$X_3$
<b>A</b>	-1	-1	0
<b>B</b>	1	-1	0
<b>C</b>	-1	1	0
<b>D</b>	1	1	0
<b>E</b>	-1	0	-1
<b>F</b>	1	0	-1
<b>G</b>	-1	0	1
<b>H</b>	1	0	1
<b>I</b>	0	-1	-1
<b>J</b>	0	1	-1
<b>K</b>	0	-1	1
<b>L</b>	0	1	1
<b>M</b>	0	0	0
<b>N</b>	0	0	0
<b>O</b>	0	0	0

$X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  são os fatores  
 Fonte: Ferreira *et al.* (2007).

Nesse trabalho, um planejamento Box-Behnken, com triplicata no ponto central, envolvendo três fatores (concentração do BGE, voltagem aplicada durante a injeção eletrocinética e o tempo da injeção eletrocinética) foi implementado.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e otimizar um método por Eletroforese Capilar para a determinação do biomarcador malondialdeído em amostras de urina de indivíduos submetidos ao teste de COVID-19 e em amostras de plasma de indivíduos sob suplementação de ômega 3.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinação da mobilidade eletroforética do malondialdeído.
- Utilização do *software* PeakMaster<sup>®</sup> para simulação da separação eletroforética.
- Construção de curva de mobilidade efetiva x pH.
- Otimização do preparo de amostras de urina e plasma.
- Desenvolvimento e otimização de método para determinação de malondialdeído livre e total em urina por CZE – UV.
- Desenvolvimento e otimização de método para determinação de malondialdeído livre e total em plasma por CZE – UV.
- Implementação de planejamento de experimentos Box-Behnken, com triplicata no ponto central, com os fatores concentração do BGE, voltagem aplicada durante a injeção eletrocinética e tempo da injeção eletrocinética, para otimização da pré-concentração do malondialdeído.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

A água foi purificada pelo sistema de osmose reversa (Quimis – Diadema, Brasil).

Ácido clorídrico (HCl) P.A., brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), fosfato de sódio dibásico P.A. anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e acetonitrila (ACN) P.A. – A.C.S. foram adquiridos da VETEC (Duque de Caxias, Brasil), hidróxido de sódio (NaOH) micropérola P.A. foi adquirido da Synth (Diadema, Brasil), metanol (MeOH) P.A. – A.C.S. e acetona P.A. – A.C.S. foram obtidos da Dinâmica (São Paulo, Brasil), cloreto de sódio (NaCl), ácido tricloroacético (TCA) e creatinina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A.), isopropanol P.A. foi adquirido da Cinética Reagentes e Soluções (Jandira, Brasil). Padrão de sal de malondialdeído tetrabutilamônio (MDA) e tris (hidroximetil) amino metano (TRIS) A.C.S. foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Cotia, SP, Brasil), a ureia foi adquirida da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil), o cloreto de potássio (KCl) foi adquirido da Isofar (Capivari, Duque de Caxias, R.J.). O detergente neutro Extran<sup>®</sup> MA 02 foi adquirido da Merck S.A. (Rio de Janeiro – RJ).

Solução de NaOH na concentração de  $1 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada para condicionamento do capilar e limpeza entre corridas. Soluções de NaOH  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  e TCA 16% (m/v) foram elaboradas para o preparo das amostras.

Solução estoque de CTAB foi preparada na concentração de  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  e estocada em geladeira. A solução estoque do tampão composto por TRIS ( $400 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e HCl ( $200 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi preparada e estocada em geladeira.

O BGE, composto por TRIS  $40 \text{ mmol L}^{-1}$ , HCl  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  e CTAB  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8,0, foi preparado em balão volumétrico pela mistura de volumes adequados das soluções estoque de TRIS/HCl  $400 \text{ mmol L}^{-1}/200 \text{ mmol L}^{-1}$  e CTAB  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , completando o volume com água deionizada.

#### 3.2 INSTRUMENTAÇÃO

Os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar modelo Agilent 7100 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) configurado nos comprimentos de onda de interesse (peak width > 0.1 min; 2 s response time; 2.5 Hz), controle, aquisição e tratamento dos dados em *software* (ChemStation A.06.01), disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. A

temperatura do cartucho foi mantida em 25 °C. Injeção hidrodinâmica de solução padrão de MDA ou amostra foi realizada à 50 mbar por 5 s, seguida por injeção hidrodinâmica de BGE (25 mbar por 5 s), ambos pela extremidade do capilar mais distante ao detector. A injeção eletrocínética também ocorreu pela extremidade mais distante ao detector e seguiu a seguinte ordem: água (14 mbar por 4 s), solução padrão de MDA ou amostra (-10 kV por 60 s) e BGE (25 mbar por 5 s). O sistema eletroforético foi mantido sob uma voltagem constante de - 28 kV.

Dois tipos diferentes de capilares foram utilizados:

- Capilares de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP, Polymicro Technologies, Phoenix, EUA) de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm de comprimento efetivo), 50 µm de diâmetro interno e 375 µm diâmetro externo.
- Capilares de sílica fundida revestidos com PTFE (série TSU, Polymicro Technologies, Phoenix, USA) de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm de comprimento efetivo), 75 µm de diâmetro interno e 375 µm diâmetro externo.

A medida espectrofotométrica da solução aquosa de MDA na concentração de 32 µmol L<sup>-1</sup> foi realizada em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800, *software* UVPROBE, com célula de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm), disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora.

### 3.3 PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE MDA

Os capilares foram condicionados antes da sequência de análises com solução aquosa de NaOH a 1,0 mol L<sup>-1</sup> (40 min), água deionizada (20 min) e BGE (20 min). Entre as corridas, a limpeza do capilar foi realizada com solução aquosa de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> (1 min), água deionizada (1 min), solução aquosa de MeOH 1 mol L<sup>-1</sup> (1 min), água deionizada (1 min) e BGE (1 min).

Ao final da sequência de análises, a limpeza do capilar foi realizada com solução aquosa de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> (10 min), água deionizada (10 min) e ar (5 min) e armazenado para uso posterior.

Os eletrodos de platina utilizados foram lavados em lavadora ultrassônica com isopropanol (15 min).

Os *prepunchers* foram lavados, sempre que foi observada acumulação de sujeira, da mesma forma que os eletrodos. Na mesma situação, os *vial lift stations* foram limpos com isopropanol usando um cotonete.

O alinhador é lavado com isopropanol em um banho ultrassônico por 15 min sempre que a sujeira se acumula.

Todas as micropipetas foram recalibradas frequentemente, para evitar erros adicionais no preparo das soluções/amostras, de forma a não prejudicar a precisão e exatidão.

Todas as vidrarias utilizadas foram lavadas seguindo a seguinte sequência: sonicação em banho ultrassônico utilizando detergente Extran<sup>®</sup> MA 02 na proporção de 10 mL do mesmo para 2 L de água (15 min), enxágue com água, sonicação em banho ultrassônico utilizando mistura de água e álcool comercial na proporção de 10 mL de álcool para 2 L de água (15 min), finalizando o processo com três enxágues com água deionizada.

### 3.4 AMOSTRAS DE URINA

O trabalho objetivando a determinação do biomarcador malondialdeído em amostras de urina de indivíduos submetidos ao teste de COVID-19 integra o projeto de título “Técnicas de eletromigração e cromatográficas aplicadas ao estudo de metaboloma da urina para o diagnóstico da COVID-19”.

As amostras de urina foram obtidas após autorização do Comitê de Ética do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (códigos de aceite: 4.473.404; 4.566.092; 5.039.371). Os participantes foram constituídos por pessoas maiores de 18 anos que concordaram com a sua participação perante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e preenchimento de questionário de anamnese (De Oliveira Moreira *et al.*, 2023).

Todas as coletas foram realizadas em parceria com o Lemos Laboratórios de Análises Clínicas com sede na cidade de Juiz de Fora, MG, contando com unidades de coleta em vários bairros de Juiz de Fora (Moreira, 2024).

A pesquisa foi oferecida a indivíduos maiores de 18 anos com suspeita de terem contraído a doença e que se submeteram ao teste de RT-PCR. Os testes de detecção do vírus SARS-CoV-2 foram realizados por RT-PCR utilizando o TaqPath<sup>™</sup> COVID-19 CE-IVD RT-PCR KiT da Thermo Fisher Scientific (Palo Alto, CA, EUA) que detecta o vírus nas amostras de esfregaço (*swab*) nasofaríngeo com sensibilidade mínima de 10 cópias genômicas. Os resultados foram processados utilizando o *software* interpretativo COVID-19 da Thermo Fisher Scientific (Palo Alto, CA, EUA) (THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2021) (Moreira, 2024).

Cada voluntário fez a coleta em tubos de centrífuga do tipo Falcon de 50 mL, armazenando-os em sacos plásticos do tipo *zip lock*. A coleta foi realizada durante seis meses,

de forma diária. As doações ocorreram em horários aleatórios do dia sem qualquer preparo prévio dos voluntários (Moreira, 2024).

Após a coleta, as amostras passaram por um processo de triagem no qual foi adicionado aos tubos 10% (v/v) de uma solução de acetona:metanol (60:40) para inativação de eventuais particulados virais. Em seguida, as amostras foram congeladas e enviadas ao laboratório do Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ), localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, via transporte específico para amostras biológicas. O material de cada um desses tubos foi dividido em cinco tubos de centrifuga do tipo Falcon de 15 mL. Após a selagem e codificação desses tubos, eles foram mantidos em ultra freezer a -50 °C (De Oliveira Moreira *et al.*, 2023; Moreira, 2024).

A equipe envolvida no projeto usou equipamentos de proteção individual (EPIs) durante o manuseio das amostras. Os EPIs contaram com avental descartável, protetor facial, máscara, sapato emborrachado hospitalar e luvas descartáveis. O material residual foi descartado em *containers* específicos para material biológico infectante, sendo posteriormente coletado pelo setor de Sustentabilidade da UFJF, o qual foi incinerado e/ou descontaminado por autoclave (Moreira, 2024).

### 3.5 AMOSTRAS DE PLASMA

O trabalho objetivando a determinação do biomarcador malondialdeído em amostras de plasma de indivíduos sob suplementação de ômega 3 integra o projeto aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (código do parecer: 4.731.228) (Lima, 2024).

O estudo contou com 24 voluntários do sexo masculino e feminino com idades entre 29 e 59 anos apresentando excesso de peso e resistência à insulina, que atenderam aos critérios de inclusão e que concordaram com a sua participação perante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Dessa forma, os voluntários foram divididos em dois grupos de 12 indivíduos: um grupo que foi suplementado com óleo de peixe (fonte de ômega 3) e o outro grupo (controle) que foi suplementado com óleo de soja. As cápsulas de ômega 3 eram constituídas por cerca de 4 g de óleo de peixe, sendo 2,4 g de ácido eicosapentaenoico (EPA, do inglês *eicosapentaenoic acid*) e ácido docosahexaenoico (DHA do inglês, *docosahexaenoic acid*). As cápsulas controle (placebo) eram compostas por óleo de soja de tamanho, cor, e odor parecidos às capsulas de ômega 3 (Lima, 2024).

De início, o paciente foi submetido à coleta de sangue e avaliações pertinentes ao estudo. Após 60 dias de consumo das cápsulas de ômega 3 ou controle, os mesmos retornavam para reavaliação e nova coleta de sangue. A coleta de sangue dos voluntários ocorreu no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, Unidade Dom Bosco (Lima, 2024).

O sangue foi coletado de voluntários em jejum por 12 h, por meio das veias do antebraço. Ele foi devidamente acondicionado em tubo sem gel separador contendo heparina. Todo o procedimento foi realizado por um profissional devidamente capacitado. Após a coleta, o plasma foi separado da série vermelha por meio de centrifugação (3000 rpm por 10 min). Após a centrifugação, o plasma foi armazenado em microtubos do tipo *ependorf* na cor âmbar em alíquotas de 200 µL. Todas as amostras foram armazenadas em ultra freezer, à temperatura de -50 °C para posterior análise (Lima, 2024).

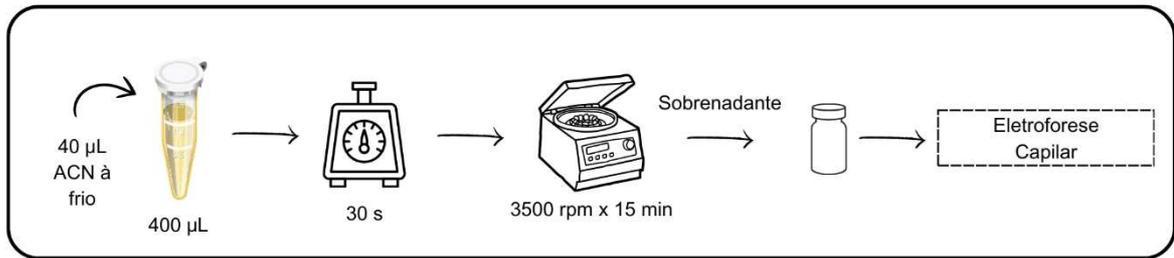
### 3.6 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

O procedimento de preparação das amostras consistiu inicialmente em descongelar as amostras de urina ou plasma em temperatura ambiente por 20 min.

#### 3.6.1 Procedimento de preparo das amostras de urina para a determinação de MDA livre

O tratamento da amostra de urina para a determinação de MDA livre foi baseado no trabalho de De Oliveira Moreira e colaboradores (2023). Após descongelamento das amostras em temperatura ambiente, foi adicionado 10% (v/v) de ACN frio à 400 µL de amostra de urina para precipitação de proteína, seguido de agitação em vórtex por 30 s e centrifugação (3500 rpm x 15 min). Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido diretamente para um *vial* e injetado no equipamento de CE. O esquema de preparação da amostra para medição de MDA livre em urina é mostrado na Figura 10 (De Oliveira Moreira *et al.*, 2023; Do Nascimento *et al.*, 2023).

Figura 10 – Esquema de preparo de amostras de urina para a determinação de MDA livre

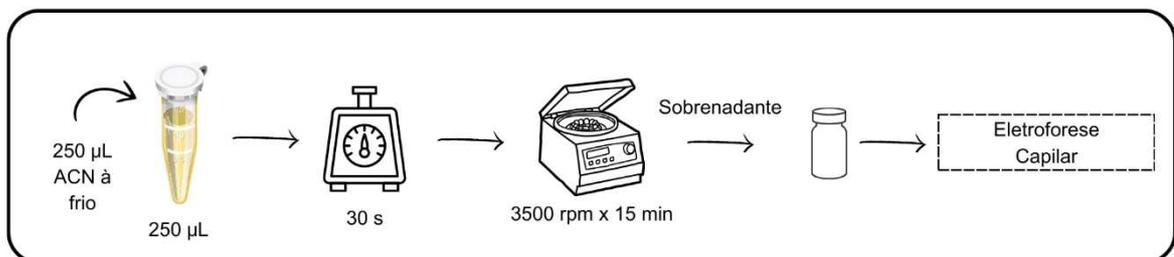


Fonte: Elaborado pela autora (2025).

### 3.6.2 Procedimento de preparo das amostras de plasma para a determinação de MDA livre

Após descongelamento das amostras em temperatura ambiente, foi adicionado ACN à frio à 250 µL de amostra (1:1, v/v) de plasma para precipitação de proteína, seguido de agitação em vórtex por 30 s e centrifugação (3500 rpm x 15 min). Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido diretamente para um *vial* e injetado no equipamento de CE. O esquema de preparação da amostra para medição de MDA livre em plasma é mostrado na Figura 11.

Figura 11 – Esquema de preparo de amostras de plasma para a determinação de MDA livre



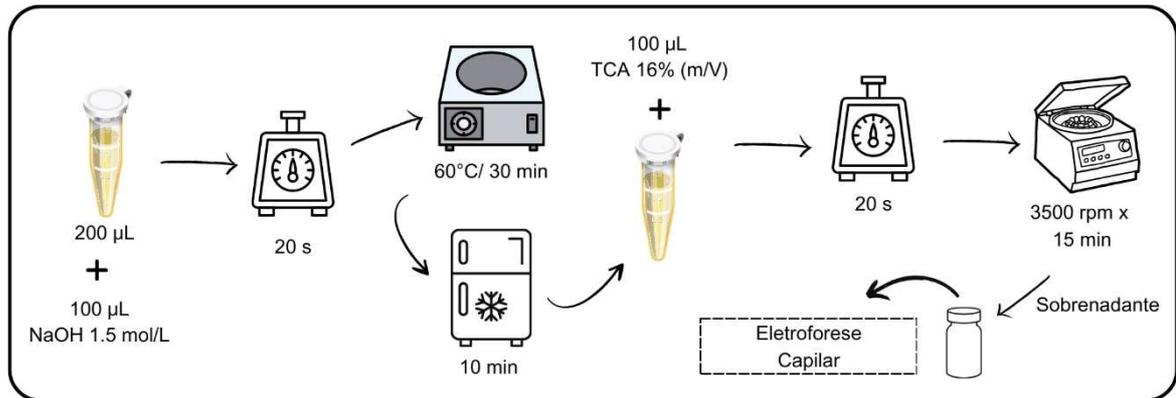
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

### 3.6.3 Procedimento de preparo de amostras para a determinação de MDA total em urina e plasma

Para a medição do MDA total, as amostras de urina e plasma passaram pelo seguinte processo de hidrólise alcalina: 200 µL da amostra foram hidrolisados pela adição de 100 µL de NaOH 1,5 mol L<sup>-1</sup> e agitação em vórtex por 20 s. Essa mistura foi incubada a 60 °C por 30 min em banho-maria, resfriada por 10 min em refrigerador e adicionada de 100 µL de TCA 16% (m/v), seguido de agitação em vórtex por 20 s e centrifugação (3500 rpm x 15 min). Após a

centrifugação, o sobrenadante de cada amostra foi transferido diretamente para um *vial* e injetado no equipamento de CE. O esquema de preparo da amostra para medição do MDA total é mostrado na Figura 12 (Antunes *et al.*, 2008; Chango *et al.*, 2024; Grotto *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2017; Paroni; Fermo; Cighetti, 2002; Sim *et al.*, 2003).

Figura 12 – Esquema de preparo de amostras para a determinação de MDA total



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

### 3.7 AMOSTRA SINTÉTICA DE URINA

A matriz sintética de urina foi preparada para avaliação de efeito de matriz e implementação de curva de calibração por semelhança de matriz. Seguiu-se os protocolos descritos por Godoy e colaboradores (2020) e Moreira e colaboradores (2023) pela mistura de 0,375 g de NaCl, 0,225 g de KCl, 0,91 g de ureia, 0,24 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 g de creatinina e 0,0025 g de albumina em 50 mL de água deionizada. Esta amostra sintética passou pelo protocolo de triagem descrito na seção 3.4, sendo armazenada em um ultra freezer a -50 °C. As amostras sintéticas foram preparadas usando o mesmo processo de preparação de amostra real apresentado na seção 3.6 (De Oliveira Moreira *et al.*, 2023; Godoy; Eberlin; Simionato, 2020).

### 3.8 PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN

A otimização da pré-concentração de analitos pela FASI foi realizada pela implementação de um planejamento de experimentos Box-Behnken com triplicata no ponto central envolvendo três fatores e três níveis, como pode ser visualizado na Tabela 2, que relaciona os níveis utilizados para cada um dos fatores.

Tabela 2 – Níveis utilizados para a implementação do planejamento Box Behnken

Níveis	Fatores		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
<b>(-1)</b>	40/20	-10	20
<b>0</b>	70/35	-15	60
<b>(+1)</b>	100/50	-20	100

X<sub>1</sub>: Concentração do BGE (mmol L<sup>-1</sup>), composto por TRIS/ HCl e CTAB

A concentração do CTAB foi mantida fixa e igual a 2,5 mmol L<sup>-1</sup>

X<sub>2</sub>: Voltagem aplicada durante a injeção eletrocinética (kV)

X<sub>3</sub>: Tempo da injeção eletrocinética (s)

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A Tabela 3 apresenta as condições experimentais correspondentes aos 15 ensaios realizados pela injeção de solução padrão de MDA em água na concentração de 1 µmol L<sup>-1</sup>. A resposta avaliada foi a área de sinal do MDA. Porém, também foi analisado o perfil dos eletroferogramas obtidos.

Para a concentração do BGE, variou-se a concentração do TRIS e HCl, enquanto a concentração do CTAB foi mantida fixa e igual a 2,5 mmol L<sup>-1</sup>.

Tabela 3 – Condições avaliadas no planejamento Box-Behnken

<b>Ensaio</b>	<b>Concentração do BGE (mmol L<sup>-1</sup>)*</b>	<b>Voltagem da injeção eletrocínética (kV)</b>	<b>Tempo da injeção eletrocínética (s)</b>
<b>A</b>	40/20	-10	60
<b>B</b>	100/50	-10	60
<b>C</b>	40/20	-20	60
<b>D</b>	100/50	-20	60
<b>E</b>	40/20	-15	20
<b>F</b>	100/50	-15	20
<b>G</b>	40/20	-15	100
<b>H</b>	100/50	-15	100
<b>I</b>	70/35	-10	20
<b>J</b>	70/35	-20	20
<b>K</b>	70/35	-10	100
<b>L</b>	70/35	-20	100
<b>M</b>	70/35	-15	60
<b>N</b>	70/35	-15	60
<b>O</b>	70/35	-15	60

\* Concentração do BGE (mmol L<sup>-1</sup>), composto por TRIS/ HCl e CTAB  
 A concentração do CTAB foi mantida fixa e igual a 2,5 mmol L<sup>-1</sup>  
 Ensaios M, N e O correspondem ao ponto central, realizado em triplicatas autênticas  
 Fonte: Elaborado pela autora (2024).

### 3.9 AVALIAÇÃO DE ALGUMAS FIGURAS DE MÉRITO

Duas curvas de calibração em cinco níveis de concentração foram construídas para quantificar o MDA total em amostras de urina. A primeira curva foi construída com o padrão de MDA em água nas concentrações de 11,4; 64,6; 120,0; 173,4 e 226,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A segunda curva (curva de calibração por semelhança de matriz) foi implementada com o padrão de MDA em urina sintética nas concentrações de 27,2; 102,0; 176,8; 251,6 e 324,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os experimentos foram realizados aleatoriamente e em triplicatas autênticas. Os modelos de regressão foram implementados através de regressão pelo método de mínimos quadrados ordinários.

A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro – Wilk. A homocedasticidade foi verificada através do *software* MiniTab14<sup>®</sup>, pelo teste de Levene. Os testes de falta de ajuste e significância da regressão foram testados por meio de análise de variância.

A exatidão foi estimada a partir de ensaios de recuperação (R), considerando a solução padrão de MDA em água e em urina sintética. No primeiro caso, a fortificação do QC foi realizada com o MDA em três níveis de concentração: o primeiro nível da curva de calibração em água (11,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), o nível intermediário da curva (120  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e o nível mais alto (226,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). No segundo caso, a fortificação do QC foi realizada com o MDA em três níveis de concentração: o primeiro nível da curva de calibração por semelhança de matriz (27,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), o nível intermediário da curva (176,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e o nível mais alto (324,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Os testes foram realizados em triplicatas autênticas de acordo com a Equação (13), em que  $A_{A+P}$  corresponde à área do analito adicionada do padrão utilizado,  $A_A$  é a área do analito e  $A_P$  é a área do padrão (Faria *et al.*, 2008).

$$R (\%) = \frac{A_{A+P} - A_A}{A_P} \times 100 \text{ (Equação 13)}$$

A repetibilidade foi estimada pela precisão intradia e interdia. A precisão intradia foi calculada a partir de seis injeções autênticas de QC em um mesmo dia, enquanto a precisão interdia considerou doze injeções autênticas de QC em dois dias diferentes.

O LOD e o limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) foram determinados a partir da relação sinal – ruído, através das Equações (14) e (15), respectivamente. Em que  $S_{\text{ruído}}$  corresponde ao desvio padrão da linha base (ruído),  $C_{\text{an}}$  é a concentração do analito,  $H_{\text{máx}}$  é a altura máxima do pico do analito e  $H_{\text{mín}}$  é a altura mínima do pico do analito (Faria *et al.*, 2008; Ribani *et al.*, 2004).

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_{\text{ruído}} \times C_{\text{an}}}{H_{\text{máx}} - H_{\text{mín}}} \text{ (Equação 14)}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_{\text{ruído}} \times C_{\text{an}}}{H_{\text{máx}} - H_{\text{mín}}} \text{ (Equação 15)}$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

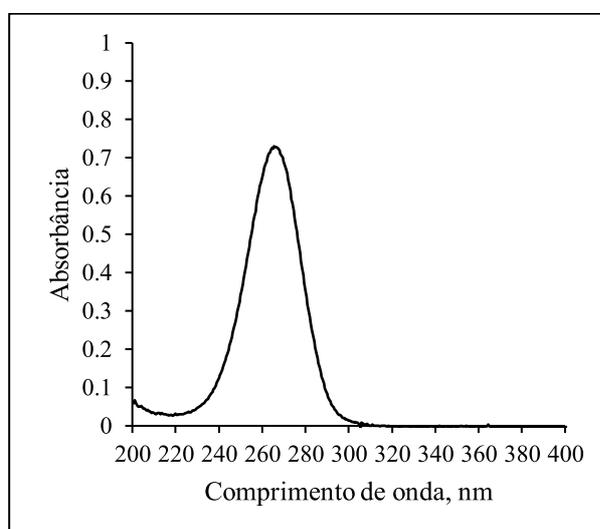
Nessa seção, serão apresentados os resultados e as respectivas discussões, incluindo o estudo espectrofotométrico do MDA, a determinação da mobilidade eletroforética do MDA, a construção de curva de mobilidade efetiva x pH, simulação no *software* PeakMaster<sup>®</sup>, estratégias para monitoramento do MDA livre e total empregando CZE – UV e quantificação de MDA total em amostras de urina de indivíduos submetidos ao teste de COVID-19.

### 4.1 ESTUDO ESPECTROFOTOMÉTRICO DO MDA

Para verificar a absorção do MDA no UV, foi feita a leitura no espectrofotômetro de uma solução aquosa de MDA na concentração de  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O espectro de absorção correspondente é apresentado na Figura 13.

Como pode ser observado na Figura 13, o espectro de absorção no UV do MDA mostra uma boa absorção nessa região, evidenciando ainda que o MDA apresenta absorbância máxima a 266 nm, de acordo com espectros disponíveis na literatura, como mostrado na Figura 4. Esse comportamento agrega ao método a vantagem de não necessitar de uma reação de derivatização para a sua detecção. Além disso, o comprimento de máxima absorção de 266 nm contribui com a seletividade do método, minimizando possíveis interferentes da matriz da amostra. Esse comprimento de onda será monitorado para a continuidade do trabalho.

Figura 13 – Espectro de absorção no UV de solução de MDA em água na concentração de  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

## 4.2 DETERMINAÇÃO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA ( $\mu_{EP}$ ) DO MDA

O valor da  $\mu_{EP}$  do MDA não é encontrado na literatura. Portanto, a  $\mu_{EP}$  do MDA foi calculada conforme discutido a seguir. Este é o primeiro trabalho a determinar a  $\mu_{EP}$  do MDA. Esse parâmetro corrobora com a literatura e fornece informações importantes para o desenvolvimento de outras pesquisas relacionadas ao MDA nas mais diversas matrizes.

A Equação (16) pode ser utilizada para calcular a  $\mu_{EP}$  do MDA.

$$\mu_{EP} = \mu_{OBS} - \mu_{EOF} \text{ (Equação 16)}$$

Observando-se a Equação (16), percebe-se que o cálculo da  $\mu_{EP}$  do MDA depende do conhecimento das  $\mu_{EOF}$  e  $\mu_{OBS}$ , que são determinadas experimentalmente.

A  $\mu_{OBS}$  (Equação (17)) foi experimentalmente determinada pela injeção de uma solução aquosa de MDA na concentração de  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$  sob condições de capilar e voltagem definidas (Tabela 4). Na Equação (17),  $L_{ef}$  corresponde ao comprimento efetivo do capilar, ou seja, o comprimento da extremidade de injeção do capilar até o detector e  $t_{MDA}$  é o tempo de migração do MDA, ou seja, o tempo requerido para o MDA migrar da injeção até o detector.

$$\mu_{OBS} = \frac{L_{ef} L}{t_{MDA} V} \text{ (Equação 17)}$$

A  $\mu_{EOF}$  (Equação (18)) também foi determinada de forma experimental. Para isso, um composto neutro (MeOH) foi injetado sob as condições da Tabela 4. Como os compostos neutros migram junto com o EOF, o tempo de migração do EOF ( $t_{EOF}$ ) corresponde ao tempo de migração do composto neutro (MeOH).

$$\mu_{EOF} = \frac{L_{ef} L}{t_{EOF} V} \text{ (Equação 18)}$$

Na Tabela 4, é possível visualizar os dados utilizados para a determinação das  $\mu_{OBS}$  e  $\mu_{EOF}$ , junto aos seus valores calculados. Com esses dados, foi possível calcular a  $\mu_{EP}$  do MDA como sendo igual a  $-39,400 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . A  $\mu_{EP}$  do MDA calculada, juntamente ao seu  $pK_a$ , serão utilizados na otimização do método eletroforético, para a construção da curva de mobilidade e simulação no *software* PeakMaster<sup>®</sup>.

Tabela 4 – Dados utilizados para o cálculo da  $\mu_{\text{OBS}}$  do MDA, da  $\mu_{\text{EOF}}$  e da  $\mu_{\text{EP}}$  do MDA

$L_{\text{ef}}$ (m)	L (m)	V (V)	$t_m$ (s)	$t_{\text{EOF}}$ (s)	$\mu_{\text{EOF}}$ ( $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\mu_{\text{OBS}}$ ( $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\mu_{\text{EP}}$ ( $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
0,400	0,485	-28000	61,020	93,480	$-7,412 \cdot 10^{-8}$	$-1,135 \cdot 10^{-7}$	$-39,400 \cdot 10^{-9}$

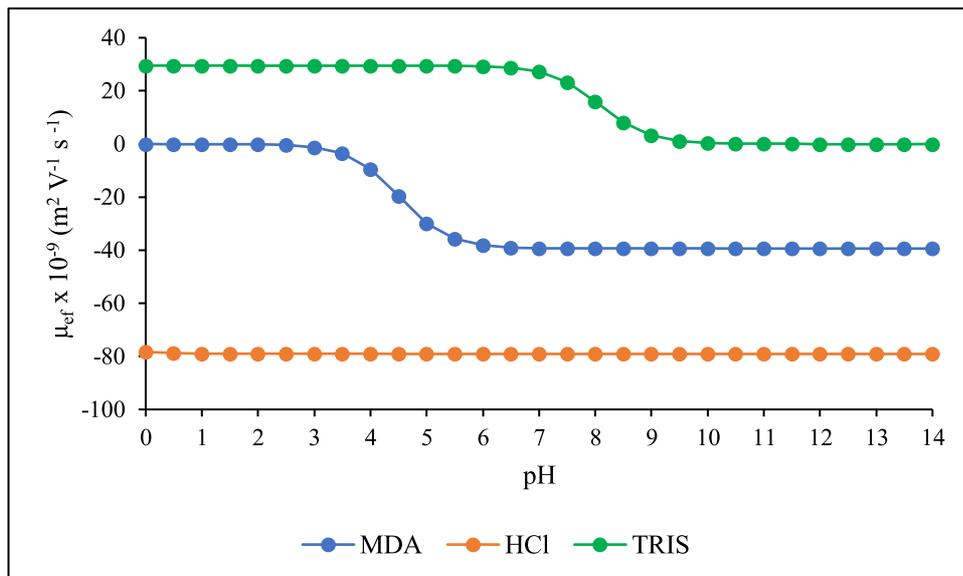
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

#### 4.3 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE MOBILIDADE EFETIVA ( $\mu_{\text{ef}}$ ) x pH

A implementação de uma curva de mobilidade efetiva ( $\mu_{\text{ef}}$ ) versus pH se apresenta como um método teórico eficiente para escolha do pH de BGEs, sendo também uma forma de avaliar os possíveis interferentes na análise, prevendo o quão separados eles estarão do analito (Tavares, 1996).

Com o valor da  $\mu_{\text{EP}}$  do MDA calculado na seção 4.2, foi possível construir a curva de  $\mu_{\text{ef}}$  x pH, conforme mostrado na Figura 14. Esta curva foi construída com os valores da  $\mu_{\text{EP}}$  do MDA (calculado na seção 4.2), do tris (hidroximetil) amino metano (TRIS) e do ácido clorídrico (HCl) (possíveis constituintes do BGE). Os valores da  $\mu_{\text{EP}}$  e do pKa do TRIS e do HCl usados para construir esta curva foram retirados do *software* PeakMaster<sup>®</sup>. O pKa do MDA foi consultado em Tsikas (2017) (Tsikas, 2017).

Figura 14 – Curva de mobilidade efetiva ( $\mu_{\text{ef}}$ ) x pH



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A partir da análise da Figura 14, a mobilidade do MDA (linha azul) varia com o pH. A espécie neutra é predominante até pH 3,5. Na faixa de pH 3,5 – 5,5, há um equilíbrio entre a espécie neutra e a ionizada (ânion enolato), sendo esta última predominante em pH acima de 5,5.

O HCl é um eletrólito forte em solução, ou seja, tem ionização completa. Portanto, sua mobilidade efetiva não varia com a mudança de pH, como observado na Figura 14, em que o  $\text{Cl}^-$  (linha laranja) apresenta mobilidade constante em toda a faixa de pH. Este comportamento não é observado no TRIS (linha verde); sua mobilidade varia com o pH. Até um pH ligeiramente acima de 7,0, a espécie predominante é a protonada, ou seja,  $\text{TRISH}^+$ . Na faixa de pH de 7,0 – 9,0, há um equilíbrio entre  $\text{TRISH}^+$  e TRIS (neutra, com mobilidade zero), sendo este último predominante em pH maior que 9,5.

Em valores de pH maiores do que 4,5, o MDA existe predominantemente como um ânion enolato (Figura 3 e Figura 14). Essa condição foi usada para desenvolver o método. Ao desenvolver um método por CZE – UV para análise de ânions, o BGE deve apresentar um ânion com mobilidade próxima ao analito aniônico para evitar eletrodispersão durante a corrida eletroforética, que é “causada pelas diferenças de condutividade entre as zonas do eletrólito e da amostra” (Fracassi Da Silva *et al.*, 2007), causando dispersão da zona durante a separação e consequente assimetria de picos (Baker, 1995; Fracassi Da Silva *et al.*, 2007; Tsikas, 2017).

O BGE formado pelo tampão TRIS/HCl é interessante para esse trabalho por dois fatores. O primeiro fator envolve a falta de capacidade tamponante do  $\text{Cl}^-$ , o que requer um contra-íon que o possua, um requisito atendido pelo TRIS. O pKa do TRIS é 8,2, o que mantém o pH de separação próximo a 8,0, compatível com a faixa de pH desejada ( $\text{pH} > 4,5$ ). O segundo envolve o desenvolvimento de um método com detecção direta no UV. Para isso, o BGE deve apresentar baixa absorvidade molar próxima ao comprimento de onda do analito. O TRIS e o ânion deste BGE ( $\text{Cl}^-$ ) são compatíveis com este requisito (Baker, 1995; Oliveira *et al.*, 2012).

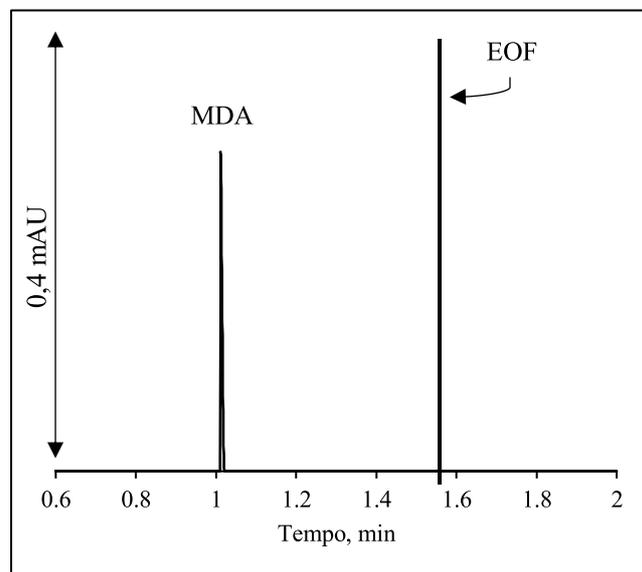
O BGE formado pelo tampão TRIS/HCl foi utilizado para a continuação da otimização do método eletroforético.

#### 4.4 SIMULAÇÃO NO *SOFTWARE* PeakMaster®

O PeakMaster® é um *software* livre, desenvolvido pelo grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Bohuslav Gaš da *Charles University*, capaz de simular a separação de compostos por CE. Como o valor  $\mu_{EP}$  do MDA não foi encontrado na literatura, ele também estava ausente deste *software*. No entanto, o artigo de De Oliveira Moreira e colaboradores (2021) fornece um guia prático para inserir novas moléculas no banco de dados do *software*. Seguindo este guia, foi possível inserir o MDA neste *software* para realizar a simulação da separação do MDA (De Oliveira Moreira; Castro; De Oliveira, 2021).

Para a simulação da Figura 15, além da inserção da  $\mu_{EP}$  do MDA, foram fornecidos dados relacionados aos constituintes do BGE, pH, inversor de EOF, voltagem, características do capilar e  $\mu_{EOF}$  calculada na seção 4.2. Como o inversor de EOF brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) está ausente do banco de dados do *software*, o hidróxido de tetradeciltrimetilamônio (TTAOH) foi usado em substituição ao CTAB, pois apresenta efeito semelhante.

Figura 15 – Eletroferograma da simulação no *software* PeakMaster®



Condições: BGE composto por 40 mmol L<sup>-1</sup> TRIS, 20 mmol L<sup>-1</sup> HCl, 2,5 mmol L<sup>-1</sup> TTAOH, voltagem: -28 kV, capilar (48,5 cm de comprimento total e 40,0 de comprimento efetivo), mobilidade do EOF ( $\mu_{EOF}$ ):  $-74,12 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O BGE deve apresentar um ânion com mobilidade próxima ao analito aniônico, quanto mais próximo o valor, menor a dispersão por eletromigração (EMD, do inglês *electromigration*

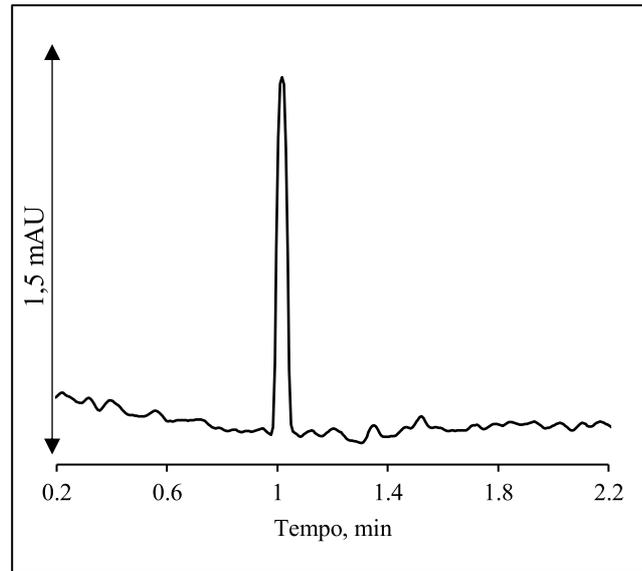
*dispersion*). A  $\mu_{EP}$  do MDA é de  $-39,400 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , enquanto a  $\mu_{EP}$  do  $\text{Cl}^-$  é de  $-79,1 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Nessa condição, a EMD obtida no eletroferograma da simulação da Figura 15 foi de 6,6, maior do que o valor ideal. Esse eletroferograma apresenta o tempo de migração do MDA em aproximadamente 1 min, enquanto o EOF foi visível próximo a 1,6 min. A força iônica do BGE obtida na simulação foi de  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , com uma capacidade tamponante de  $22,7 \text{ mmol L}^{-1}$  e condutividade de  $0,209 \text{ S m}^{-1}$ .

Assim, as melhores condições obtidas pela simulação no *software* PeakMaster® foram: BGE composto por  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  TRIS,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  HCl,  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB (pH 8,0), capilar de 48,5 cm (comprimento efetivo de 40 cm) e -28 kV de voltagem aplicada.

Uma solução aquosa de MDA ( $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi injetada no equipamento CE sob as condições simuladas no PeakMaster® (Figura 15). As outras condições experimentais consistiram em injeção hidrodinâmica de MDA a 50 mbar por 5 s, seguida pela injeção do BGE a 25 mbar por 5 s pelo lado mais distante do detector; temperatura do cartucho de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; comprimento de onda de 266 nm; capilar TSP de  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno. O programa de injeção incluiu a introdução de BGE após a amostra para evitar variação do tempo de migração e alargamento do pico. O eletroferograma correspondente pode ser visualizado na Figura 16.

Conforme visto na Figura 16, ao inverter o EOF e aplicar uma voltagem negativa no lado da injeção é possível visualizar um pico de MDA bem definido e simétrico em cerca de 1,0 min, mesmo com o EMD de 6,6 obtido na simulação da Figura 15. Uma comparação com artigos que analisam MDA em amostras biológicas usando CE mostra que este seria o método com o menor tempo de migração já desenvolvido para esta finalidade. Até então, 2,6 min era o menor tempo de migração já obtido, em um método que determinou MDA em amostras de cérebro de ratos por CZE – UV, em 1998. Nesse método, as condições eram compostas por: BGE formado por  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão borato e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB (pH 9,3), voltagem aplicada de -25 kV, injeção hidrodinâmica pela elevação do *vial* de amostra à 1,5 cm por 30 s, capilar de sílica fundida de 70 cm de comprimento total (55 cm de comprimento efetivo) e  $75 \mu\text{m}$  de diâmetro interno e detecção em 267 nm. Esta redução no tempo de migração é atrativa porque permite alto rendimento analítico, ideal para um método que poderia ser adaptado às rotinas laboratoriais de análise clínica (Do Nascimento *et al.*, 2023; Olsson *et al.*, 1998).

Figura 16 – Eletroferograma de uma solução aquosa de MDA  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$

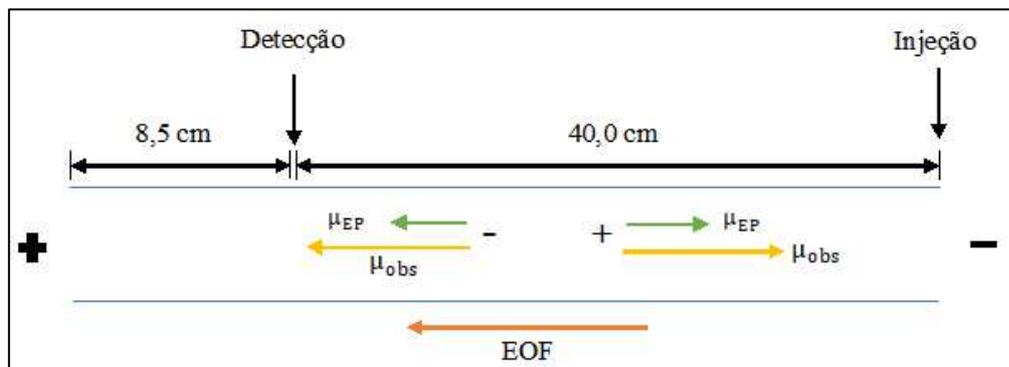


Condições: BGE composto por  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  TRIS,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  HCl,  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB (pH 8,0), temperatura do cartucho:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , voltagem:  $-28 \text{ kV}$ , injeção hidrodinâmica: MDA ( $50 \text{ mbar}$  por  $5 \text{ s}$ ) seguida por BGE ( $25 \text{ mbar}$  por  $5 \text{ s}$ ) pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda:  $266 \text{ nm}$ , capilar TSP de  $48,5 \text{ cm}$  ( $40 \text{ cm}$  de comprimento efetivo)  $\times$   $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno  $\times$   $375 \mu\text{m}$  diâmetro externo

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Com essa condição, o MDA está sendo analisado sob EOF invertido e polaridade invertida, conforme Figura 17. Nessa figura, o MDA na forma do ânion enolato se direciona ao anodo (+), no mesmo sentido do EOF (modo coeletrosmótico de migração do analito).

Figura 17 – Representação esquemática da análise de MDA sob EOF invertido e polaridade invertida



$\mu_{EP}$ : mobilidade eletroforética;  $\mu_{OBS}$ : mobilidade observada; EOF: fluxo eletrosmótico  
 Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Comparando-se as Figuras 15 e 16, o eletroferograma da simulação no PeakMaster<sup>®</sup> e o eletroferograma real obtido pela injeção de MDA nas condições otimizadas são semelhantes, mostrando que estas condições podem ser testadas em amostras reais.

Portanto, as seguintes condições foram utilizadas para a continuidade do trabalho: BGE contendo 40 mmol L<sup>-1</sup> de TRIS, 20 mmol L<sup>-1</sup> de HCl, 2,5 mmol L<sup>-1</sup> de CTAB, pH 8,0, injeção hidrodinâmica de MDA a 50 mbar por 5 s, seguida pela injeção do BGE a 25 mbar por 5 s pelo lado mais distante do detector, temperatura do cartucho de 25 °C, comprimento de onda de 266 nm, voltagem de -28 kV, capilar TSP de 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo) e 50 µm de diâmetro interno.

#### 4.5 ESTRATÉGIAS PARA MONITORAMENTO DO MDA LIVRE EMPREGANDO CZE – UV

O MDA pode ser encontrado em materiais biológicos na forma livre ou ligada aos grupos SH e NH<sub>2</sub> de proteínas e ácidos nucleicos. Assim, o MDA pode ser determinado como MDA livre ou como MDA total, que consiste na soma do MDA livre e do MDA ligado (Do Nascimento *et al.*, 2023).

##### 4.5.1 Estratégias para monitoramento do MDA livre nas amostras de urina empregando CZE – UV

As condições eletroforéticas otimizadas foram aplicadas à medição do MDA livre e do MDA total. A diferença entre as duas consiste na etapa de preparo da amostra. Os testes de preparação da amostra foram realizados em uma amostra de urina selecionada aleatoriamente (Do Nascimento *et al.*, 2023).

A determinação de MDA livre em amostras biológicas pode ser realizada perante apenas a uma precipitação de proteínas com um solvente orgânico, conforme mostrado na Figura 10 (Do Nascimento *et al.*, 2023).

A Figura 18 mostra os eletroferogramas de MDA livre na amostra de urina selecionada aleatoriamente e na mesma amostra de urina enriquecida com 32 µmol L<sup>-1</sup> de MDA.

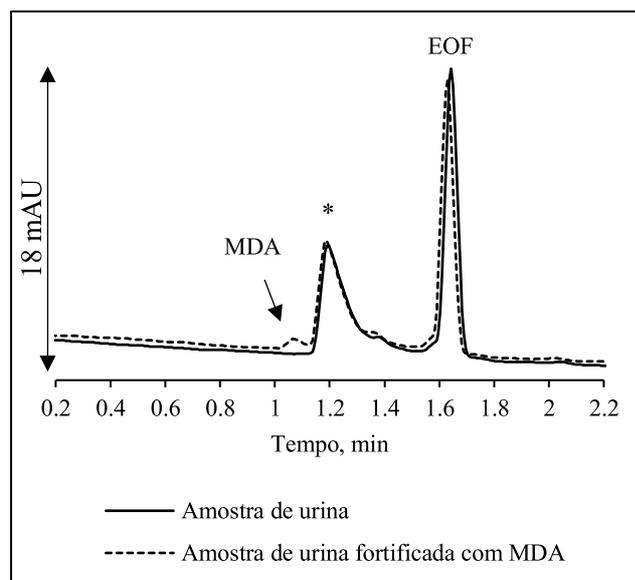
Analisando-se a Figura 18, a amostra de urina apresenta um pico não identificado em 1,187 min e um pico em 1,629 min correspondente ao EOF. Ao fortificar a amostra de urina com MDA na concentração de 32 µmol L<sup>-1</sup>, um pico correspondente ao MDA foi visualizado

em 1,068 min, ausente no eletroferograma de urina, de forma que o MDA livre não pode ser detectado na amostra de urina.

Foram calculados o LOD e o LOQ do MDA livre. Uma vez que no eletroferograma do MDA livre na amostra de urina não foi detectado sinal do MDA, o LOD e o LOQ foram calculados pelo eletroferograma da fortificação da amostra de urina com MDA na concentração de  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Aplicando-se as Equações (14) e (15), o LOD calculado foi de  $1,27 \mu\text{mol L}^{-1}$  e o LOQ correspondeu a  $4,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Assim, o método otimizado não determinou o MDA livre na urina. Esse resultado foi consistente com resultados da literatura, que afirmam que o MDA livre constitui uma pequena fração do MDA urinário (Cui *et al.*, 2018).

Figura 18 – Eletroferogramas do MDA livre na amostra de urina e amostra de urina enriquecida com MDA  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$



Condições: BGE composto por  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  TRIS,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  HCl,  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB (pH 8,0), temperatura do cartucho:  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , voltagem:  $-28 \text{ kV}$ , injeção hidrodinâmica: MDA ( $50 \text{ mbar}$  por  $5 \text{ s}$ ) seguida por BGE ( $25 \text{ mbar}$  por  $5 \text{ s}$ ) pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda:  $266 \text{ nm}$ , capilar TSP de  $48,5 \text{ cm}$  ( $40 \text{ cm}$  de comprimento efetivo) x  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno x  $375 \mu\text{m}$  diâmetro externo

\* Pico não identificado

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

#### 4.5.1.1 Pré-concentração do MDA livre

Com o objetivo de detectar o MDA livre nas amostras de urina, decidiu-se empregar uma técnica de pré-concentração de analitos. De modo a obter um método com uma etapa de tratamento de amostras mais rápido e simples, foi proposta a implementação da pré-concentração *on-line* do analito, ou seja, a pré-concentração do analito dentro do capilar. A técnica utilizada foi a FASI.

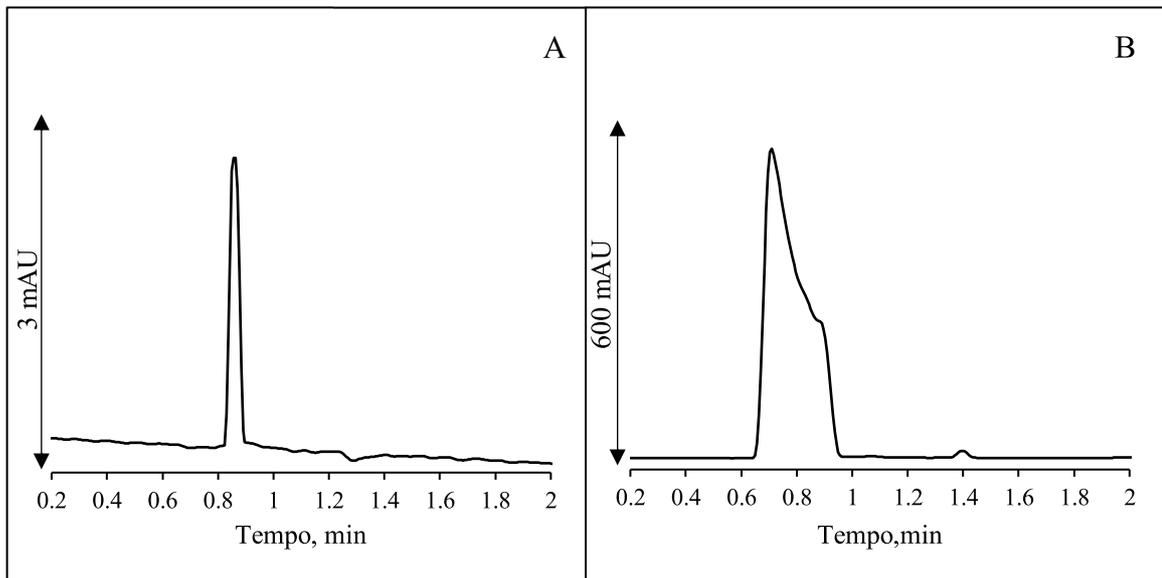
Para isso, se baseando no trabalho de Zinellu e colaboradores (2011), foi realizada a injeção hidrodinâmica de um plug de água (14 mbar por 4 s) seguida pela injeção eletrocínica de uma solução de MDA (-10 kV por 100 s) na concentração de  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ . As outras condições de análise seguiram as seções 4.3 e 4.4 (Zinellu *et al.*, 2011b).

Até o momento, o capilar utilizado era o de sílica fundida da série TSP de 48,5 cm de comprimento total e  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno. Porém, a otimização da pré-concentração do MDA foi realizada em um capilar TSU de 48,5 cm de comprimento total e  $75 \mu\text{m}$  de diâmetro interno.

Os eletroferogramas correspondentes à injeção hidrodinâmica, como realizado nas seções 4.3 e 4.4, e à FASI estão mostrados na Figura 19. A concentração de  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi escolhida para esses testes, pois essa concentração é detectada também com a injeção hidrodinâmica, como visto na seção 4.4, possibilitando a comparação entre os dois modos de injeção.

Pela avaliação da Figura 19A, ao fazer a injeção hidrodinâmica da solução de  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MDA, a área foi de 3,3 mAU (tempo de migração de 0,86 min). Ao fazer a pré-concentração pela técnica FASI, a área de MDA foi 4841,7 mAU (tempo de migração de 0,709 min) (Figura 19B). Conclui-se assim que a FASI realmente realiza o aumento da área do analito, com enriquecimento significativo. Porém, o aumento da área foi acompanhado pelo alargamento do pico do MDA, que se tornou assimétrico, o que se reflete no número de pratos teóricos. De fato, o número de pratos teóricos calculado para o eletroferograma da Figura 19A é igual a 1898, enquanto na Figura 19B é 77. Sabe-se que quanto maior o número de pratos teóricos, mais estreito o pico se torna em um eletroferograma, portanto, o baixo número de pratos teóricos na Figura 19B reflete o alargamento do pico visualizado (Baker, 1995).

Figura 19 – Eletroferogramas da solução de MDA  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$  com injeção hidrodinâmica e FASI



Condições: BGE composto por  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  TRIS,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  HCl,  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB (pH 8,0), temperatura do cartucho:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , voltagem:  $-28 \text{ kV}$ , comprimento de onda:  $266 \text{ nm}$ , capilar TSU de  $48,5 \text{ cm}$  ( $40 \text{ cm}$  de comprimento efetivo)  $\times$   $75 \mu\text{m}$  de diâmetro interno  $\times$   $375 \mu\text{m}$  de diâmetro externo. A: Injeção hidrodinâmica da solução padrão de MDA:  $25 \text{ mbar}$  por  $5 \text{ s}$  pelo lado mais distante ao detector. B: FASI: injeção hidrodinâmica de água ( $14 \text{ mbar}$  por  $4 \text{ s}$ ) e injeção eletrocinética da solução padrão de MDA ( $-10 \text{ kV}$  por  $100 \text{ s}$ ), ambas pelo lado mais distante ao detector

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

#### 4.5.1.1.1 Otimização da FASI

A otimização da pré concentração de analitos pela FASI foi realizada com o objetivo de obter a condição que proporciona o maior sinal (maior enriquecimento) com o menor tempo de injeção possível, e com um pico sem alargamento e simétrico. Para isso, foi proposto um planejamento de experimentos Box-Behnken com triplicata no ponto central ( $C_0 = 3$ ), envolvendo três fatores ( $k = 3$ ) e três níveis ( $n = 3$ ), totalizando 15 experimentos ( $N = 15$ ).

Os fatores avaliados nesse planejamento foram a concentração do BGE, a voltagem aplicada durante a injeção eletrocinética e o tempo da injeção eletrocinética, conforme as Tabelas 2 e 3.

Como pode ser visualizado na Tabela 3, a concentração do BGE assumiu como menor nível a concentração otimizada nas seções 4.3 e 4.4, ou seja,  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  TRIS,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  HCl e  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB. Assim, nesse planejamento variou-se a concentração do TRIS e do HCl, enquanto a concentração do CTAB foi mantida fixa e igual a  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ .

A voltagem aplicada assumiu como menor nível a voltagem de -10 kV, já utilizada para a obtenção do eletroferograma da Figura 19, conforme realizado por Zinellu e colaboradores (2011). Os outros níveis corresponderam a -15 kV e -20 kV (Zinellu *et al.*, 2011b).

O maior nível do tempo da injeção eletrocinética correspondeu a 100 s conforme eletroferograma da Figura 19. O intuito de fixar 100 s como maior nível foi obter um enriquecimento significativo com o menor tempo de injeção possível (Zinellu *et al.*, 2011b).

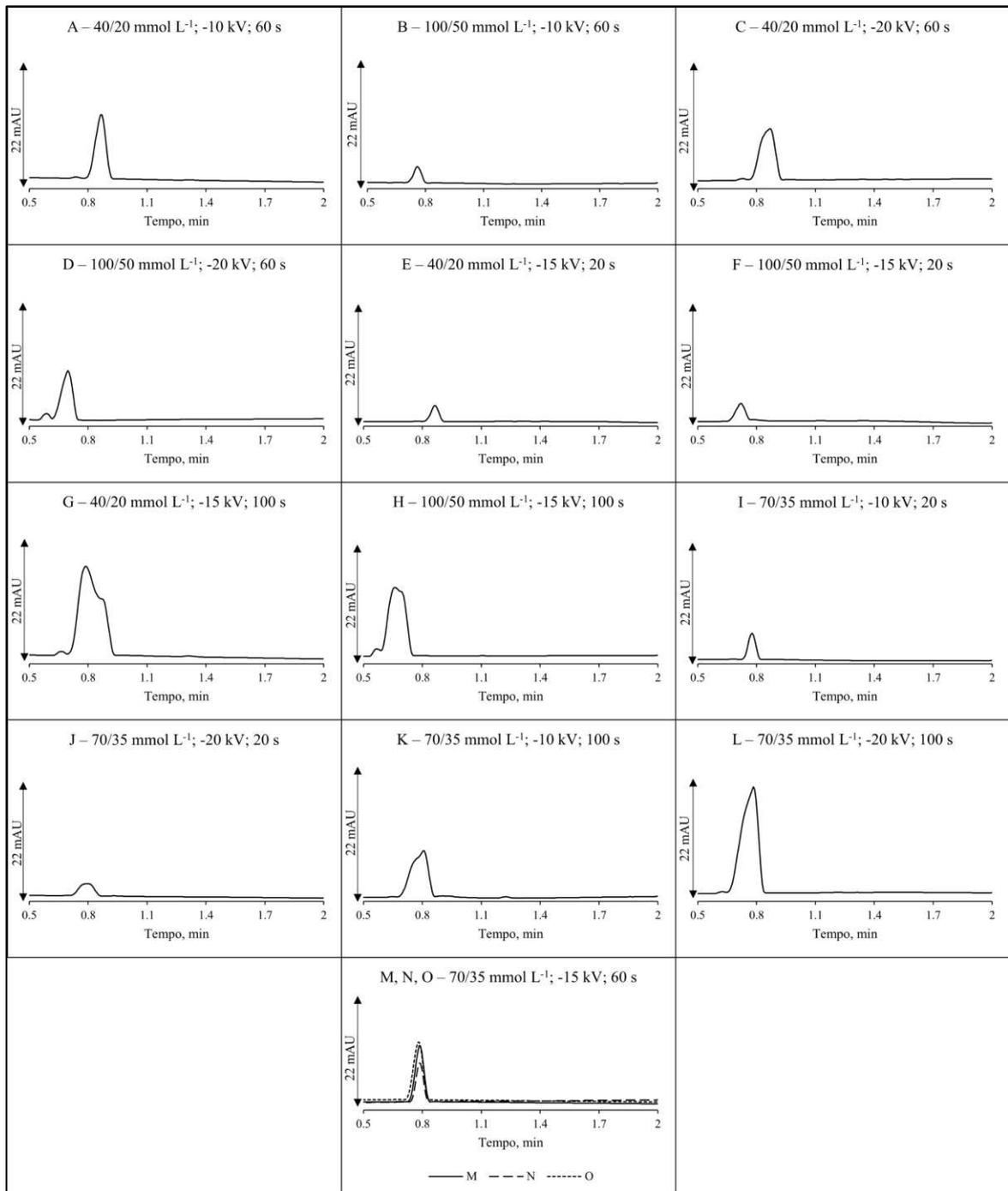
Dessa forma, a Tabela 5 apresenta a resposta de cada ensaio realizado e a Figura 20 mostra o eletroferograma obtido para cada experimento. Salientando-se que foi feita a injeção de solução padrão de MDA em água na concentração de 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Tabela 5 – Resposta do planejamento Box-Behnken

<b>Ensaio</b>	<b>Concentração do BGE (<math>\text{mmol L}^{-1}</math>)*</b>	<b>Voltagem da injeção eletrocinética (kV)</b>	<b>Tempo da injeção eletrocinética (s)</b>	<b>Área (mAU)</b>
<b>A</b>	40/20	-10	60	38,2
<b>B</b>	100/50	-10	60	7,4
<b>C</b>	40/20	-20	60	43,5
<b>D</b>	100/50	-20	60	30,1
<b>E</b>	40/20	-15	20	7,2
<b>F</b>	100/50	-15	20	9,0
<b>G</b>	40/20	-15	100	110,1
<b>H</b>	100/50	-15	100	62,2
<b>I</b>	70/35	-10	20	11,2
<b>J</b>	70/35	-20	20	13,6
<b>K</b>	70/35	-10	100	60,1
<b>L</b>	70/35	-20	100	96,8
<b>M</b>	70/35	-15	60	34,6
<b>N</b>	70/35	-15	60	20,9
<b>O</b>	70/35	-15	60	39,6

\* Concentração do BGE ( $\text{mmol L}^{-1}$ ), composto por TRIS/ HCl e CTAB  
 A concentração do CTAB foi mantida fixa e igual a 2,5  $\text{mmol L}^{-1}$   
 Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Figura 20 – Eletroferogramas obtidos pela implementação do planejamento Box Behnken. Injeção de solução padrão de MDA em água na concentração de  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$



Condições:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-28 \text{ kV}$ ,  $266 \text{ nm}$ , capilar TSU de  $48,5 \text{ cm}$  ( $40 \text{ cm}$  de comprimento efetivo)  $\times$   $75 \mu\text{m}$  de diâmetro interno  $\times$   $375 \mu\text{m}$  diâmetro externo). A concentração do BGE assim como a voltagem aplicada e o tempo da injeção eletrocínica estão indicadas em cada eletroferograma. A injeção hidrodinâmica de água ( $14 \text{ mbar}$  por  $4 \text{ s}$ ) precede a injeção eletrocínica (lado mais distante ao detector). [CTAB]:  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$   
 Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Avaliando-se a Tabela 5 e a Figura 20, os ensaios que resultaram em melhores áreas foram o G (110,1 mAU), L (96,8 mAU), H (62,2 mAU) e K (60,1 mAU). Esses 4 ensaios têm em comum o maior tempo da injeção eletrocinética considerado nesse planejamento, que foi 100 s. Porém, assim como aconteceu no eletroferograma da Figura 19B, houve um alargamento do pico, que pode comprometer a análise.

Os ensaios que apresentaram menores áreas corresponderam ao ensaio E (7,2 mAU), B (7,4 mAU), F (9 mAU), I (11,2 mAU) e J (13,6 mAU). Os experimentos que correspondem ao ponto central (M, N e O) apresentaram baixa precisão. De fato, a média da área de sinal do MDA foi de  $31,7 \pm 9,7$  mAU (desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) de 30,5 %) para esses experimentos. O ensaio D apesar de contar com uma área significativa de 30,1 mAU, apresentou um pico não identificado próximo ao pico do MDA, que pode influenciar nos resultados (Tabela 5 e Figura 20).

Ao comparar os ensaios A e C, apesar do ensaio C apresentar uma área mais elevada em relação ao ensaio A (43,5 e 38,2 mAU, respectivamente), o ensaio A exibe um eletroferograma mais simétrico, como pode ser visualizado na Tabela 5 e na Figura 20.

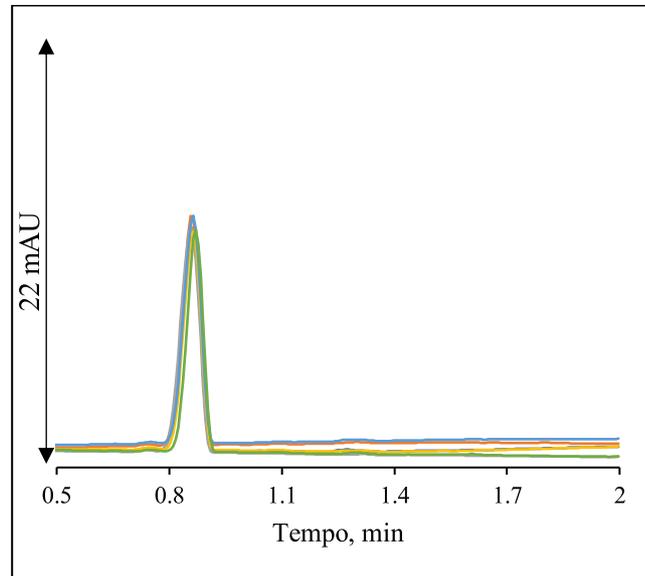
O ensaio A apresenta um BGE composto por  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  TRIS,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  HCl e  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB (pH 8,0) e injeção eletrocinética com aplicação de -10 kV de voltagem por 60 s. Esse ensaio passou por um teste de repetibilidade. Para isso, soluções padrão de MDA em água na concentração de  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  foram injetadas 6 vezes, de forma autêntica, no CE seguindo as condições experimentais do ensaio A. Os valores do RSD dessa avaliação para a área do pico e tempo de migração são mostrados na Tabela 6. Os eletroferogramas correspondentes são apresentados na Figura 21.

Tabela 6 – Valores de RSD para o teste de repetibilidade do ensaio A, realizado por seis injeções autênticas de solução padrão de MDA em água na concentração de  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$

<b>RSD – Área de sinal (%)</b>	<b>RSD – Tempo de migração (%)</b>
5,5	0,5

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Figura 21 – Eletroferogramas correspondentes ao teste de repetibilidade do ensaio A, realizado por seis injeções autênticas de solução padrão de MDA em água na concentração de  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$

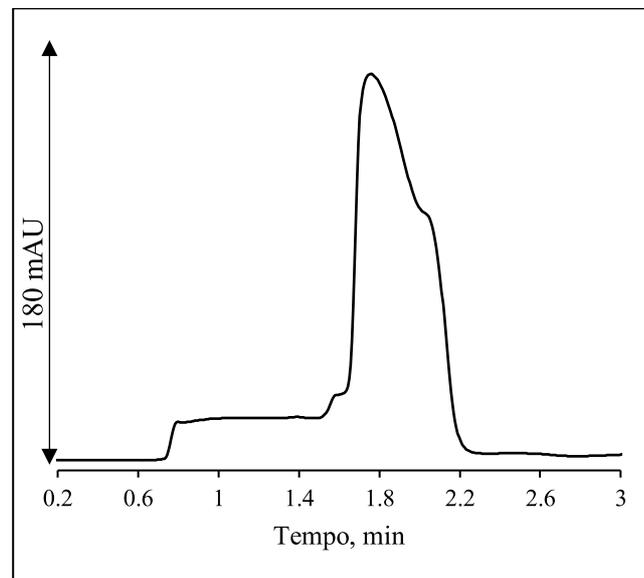


Condições: BGE composto por  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  TRIS,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  HCl,  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB (pH 8,0), temperatura do cartucho:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , voltagem:  $-28 \text{ kV}$ , comprimento de onda:  $266 \text{ nm}$ , capilar TSU de  $48,5 \text{ cm}$  ( $40 \text{ cm}$  de comprimento efetivo) x  $75 \mu\text{m}$  de diâmetro interno x  $375 \mu\text{m}$  de diâmetro externo, injeção hidrodinâmica de água ( $14 \text{ mbar}$  por  $4 \text{ s}$ ) seguida por injeção eletrocínética da solução padrão de MDA ( $-10 \text{ kV}$  por  $60 \text{ s}$ ), ambas pelo lado mais distante ao detector  
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Avaliando-se a Tabela 6 e a Figura 21, o ensaio A apresenta um RSD de  $5,5\%$  para a área do pico e  $0,5\%$  para o tempo de migração do MDA, que são considerados aceitáveis. Dessa forma, as condições referentes ao ensaio A foram utilizadas para a continuidade do trabalho envolvendo a pré-concentração de analitos pela FASI. Essas condições correspondem a: BGE composto por  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  TRIS,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  HCl,  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB (pH 8,0), temperatura do cartucho de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , voltagem de  $-28 \text{ kV}$ , comprimento de onda correspondente a  $266 \text{ nm}$ , capilar TSU de  $48,5 \text{ cm}$  ( $40 \text{ cm}$  de comprimento efetivo),  $75 \mu\text{m}$  de diâmetro interno e  $375 \mu\text{m}$  de diâmetro externo, injeção hidrodinâmica de água ( $14 \text{ mbar}$  por  $4 \text{ s}$ ) seguida por injeção eletrocínética ( $-10 \text{ kV}$  por  $60 \text{ s}$ ), ambas pelo lado mais distante ao detector.

A amostra de urina selecionada aleatoriamente foi submetida ao tratamento de amostras da Figura 10 (preparo de amostra de urina para análise de MDA livre) e injetada no equipamento de CE sob as condições do ensaio A. O eletroferograma obtido é apresentado na Figura 22.

Figura 22 – Eletroferograma da pré-concentração da amostra de urina sob as condições do ensaio A



Condições: BGE composto por 40 mmol L<sup>-1</sup> TRIS, 20 mmol L<sup>-1</sup> HCl, 2,5 mmol L<sup>-1</sup> CTAB (pH 8,0), temperatura do cartucho: 25 °C, voltagem: -28 kV, comprimento de onda: 266 nm, capilar TSU de 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo) x 75 µm de diâmetro interno x 375 µm de diâmetro externo, injeção hidrodinâmica de água (14 mbar por 4 s) seguida por injeção eletrocinética da solução padrão de MDA (-10 kV por 60 s), ambas pelo lado mais distante ao detector  
 Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Comparando-se as Figuras 22 e 18, percebe-se o aumento da intensidade dos picos. De fato, a intensidade dos sinais na Figura 18 era de 18 mAU e da Figura 22 é de 180 mAU. Porém, ao realizar o enriquecimento pela FASI, o pico não identificado em 1,187 min e o pico correspondente ao EOF em 1,629 min mostrados no eletroferograma da Figura 18 comigraram e geraram a elevação da linha base observada na Figura 22, não sendo possível observar pico do MDA nessa figura. Dessa forma, não foi possível detectar o MDA livre na amostra de urina aplicando-se a pré-concentração de analitos com a FASI.

#### 4.5.2 Estratégias para monitoramento do MDA livre nas amostras de plasma empregando CZE – UV

As condições eletroforéticas otimizadas nas seções 4.3 e 4.4 foram aplicadas à medição do MDA livre nas amostras de plasma. Os testes de preparação da amostra foram realizados em uma amostra de plasma.

#### 4.5.2.1 Preparo de amostras para o monitoramento de MDA livre nas amostras de plasma

Para o tratamento da amostra de plasma, inicialmente tentou-se realizar a precipitação de proteínas de acordo com a Figura 10, ou seja, com adição de 10% (v/v) de ACN à frio, como realizado nas amostras de urina. Porém, percebeu-se que esse procedimento foi insuficiente para a precipitação de proteínas, dado que a solução se manteve turva, mesmo após centrifugação.

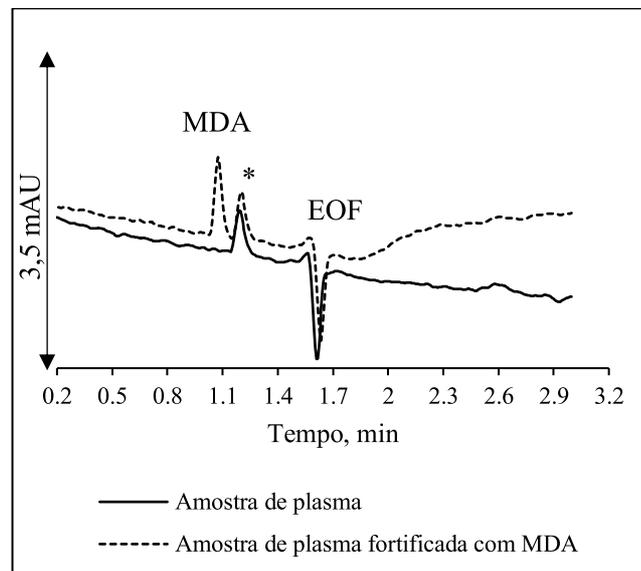
Diante disso, a precipitação de proteínas foi realizada pela adição de ACN à frio à amostra (1:1, v/v) seguida por agitação em vórtex e centrifugação (conforme Figura 11). Com esse procedimento, houve uma separação adequada do sobrenadante e do precipitado. Portanto, o sobrenadante foi transferido diretamente para um *vial* e injetado no equipamento de CE.

A Figura 23 apresenta os eletroferogramas de MDA livre na amostra de plasma e na mesma amostra de plasma enriquecida com 32  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de MDA.

Pela avaliação da Figura 23, a amostra de plasma apresenta um pico não identificado em 1,202 min e um pico em 1,634 min que corresponde ao EOF. Ao fortificar a amostra de plasma com MDA na concentração de 32  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , um pico correspondente ao MDA foi visualizado em 1,076 min, ausente no eletroferograma de plasma. Assim, o método otimizado não determinou MDA livre em plasma.

Foram calculados o LOD e o LOQ do MDA livre na amostra de plasma. Uma vez que no eletroferograma do MDA livre na amostra de plasma, o sinal do MDA não foi detectado, o LOD e o LOQ foram estimados pelo eletroferograma da fortificação da amostra de plasma com MDA na concentração de 32  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Aplicando as Equações (14) e (15), o LOD calculado foi de 1,97  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e o LOQ correspondeu a 6,56  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Figura 23 – Eletroferogramas do MDA livre na amostra de plasma e amostra de plasma enriquecida com MDA  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$



Condições: BGE composto por  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  TRIS,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  HCl,  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB (pH 8,0), temperatura do cartucho:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , voltagem:  $-28 \text{ kV}$ , injeção hidrodinâmica: MDA ( $50 \text{ mbar}$  por  $5 \text{ s}$ ) seguida por BGE ( $25 \text{ mbar}$  por  $5 \text{ s}$ ) pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda:  $266 \text{ nm}$ , capilar TSP de  $48,5 \text{ cm}$  ( $40 \text{ cm}$  de comprimento efetivo) x  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno x  $375 \mu\text{m}$  diâmetro externo

\* Pico não identificado

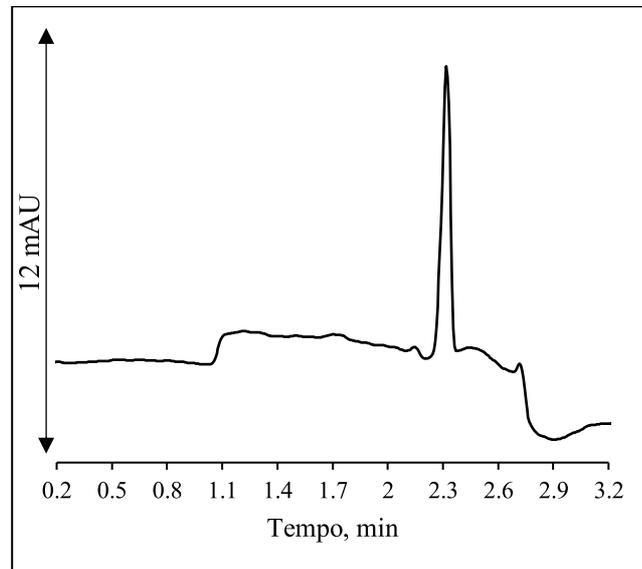
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

#### 4.5.2.2 Pré-concentração do MDA livre

A pré-concentração de analitos utilizando-se a FASI otimizada na seção 4.5.1.1 foi testada com a amostra de plasma. Dessa forma, uma amostra de plasma submetida ao tratamento de amostras da Figura 11 foi injetada no equipamento de CE sob as condições do ensaio A. O eletroferograma obtido é apresentado na Figura 24.

Como pode ser visualizado na Figura 24, houve um aumento da intensidade dos sinais em relação à Figura 23. Porém, não foi possível detectar o sinal do MDA livre na amostra de plasma aplicando-se a pré-concentração de analitos pela FASI. Além disso, foi observado uma elevação da linha base ao realizar a FASI, assim como foi observado na Figura 22 com a amostra de urina.

Figura 24 – Eletroferograma da pré-concentração da amostra de plasma sob as condições do ensaio A



Condições: BGE composto por 40 mmol L<sup>-1</sup> TRIS, 20 mmol L<sup>-1</sup> HCl, 2,5 mmol L<sup>-1</sup> CTAB (pH 8,0), temperatura do cartucho: 25 °C, voltagem: -28 kV, comprimento de onda: 266 nm, capilar TSU de 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo) x 75 µm de diâmetro interno x 375 µm de diâmetro externo, injeção hidrodinâmica de água (14 mbar por 4 s) seguida por injeção eletrocínica da solução padrão de MDA (-10 kV por 60 s), ambas pelo lado mais distante ao detector  
 Fonte: Elaborado pela autora (2024).

#### 4.6 ESTRATÉGIAS PARA MONITORAMENTO DO MDA TOTAL EMPREGANDO CZE – UV

O MDA total corresponde à soma do MDA livre e do MDA ligado a moléculas como proteínas ou ácidos nucleicos (Do Nascimento *et al.*, 2023).

##### 4.6.1 Estratégias para monitoramento do MDA total nas amostras de urina empregando CZE – UV

Para detectar o MDA ligado é necessário um tratamento hidrolítico da amostra em altas temperaturas para liberar a fração ligada em MDA livre, seguido por adição de ácido. O tratamento hidrolítico mais comum é a hidrólise alcalina com NaOH. Na sequência, a mistura é aquecida, geralmente à temperatura de 60 °C por 30 min. Posteriormente, é feita adição de um ácido, sendo o TCA e o ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) os mais comuns. Recentemente, foi publicado um método em que foi feita a adição de HCl (Antunes *et al.*, 2008; Chango *et al.*,

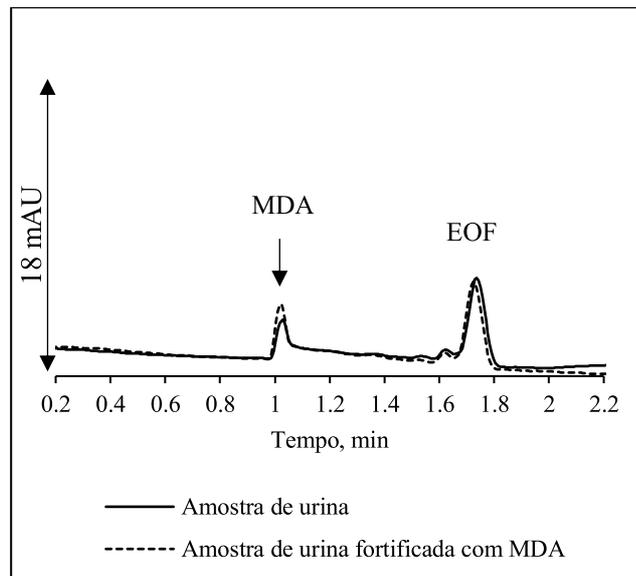
2024; Grotto *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2017; Paroni; Fermo; Cighetti, 2002; Sim *et al.*, 2003).

#### 4.6.1.1 Preparo de amostras para o monitoramento de MDA total nas amostras de urina

A hidrólise alcalina foi realizada conforme fluxograma da Figura 12.

A Figura 25 mostra o eletroferograma da amostra de urina submetida à hidrólise alcalina, com e sem fortificação de MDA a  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O eletroferograma da amostra de urina submetida ao processo de hidrólise alcalina mostrou o pico correspondente ao MDA em 1 min. Esse pico foi confirmado pela fortificação da amostra com MDA na concentração de  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Como houve aumento do sinal de pico no mesmo tempo de migração, foi confirmado que esse pico era de fato MDA.

Figura 25 – Eletroferogramas da amostra de urina submetida à hidrólise alcalina com e sem fortificação de MDA a  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$



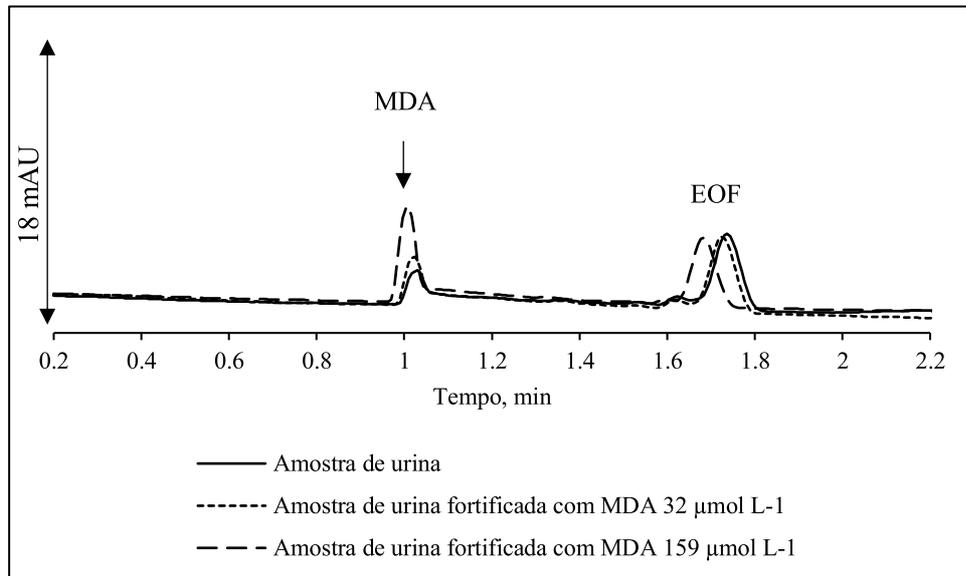
Condições: BGE composto por  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  TRIS,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  HCl,  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB (pH 8,0), temperatura do cartucho:  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , voltagem:  $-28 \text{ kV}$ , injeção hidrodinâmica: MDA (50 mbar por 5 s) seguida por BGE (25 mbar por 5 s) pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda: 266 nm, capilar TSP de 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo) x  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno x  $375 \mu\text{m}$  diâmetro externo

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A amostra de urina foi ainda fortificada com uma concentração maior de MDA ( $159 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) como verificação adicional do pico de MDA, como mostrado na Figura 26. Nesta figura, o aumento na área do pico de MDA pode ser visto ao elevar a concentração de MDA

adicionada à amostra. É essencial destacar que a fortificação da amostra com MDA é realizada antes da hidrólise alcalina.

Figura 26 – Eletroferogramas da amostra de urina submetida à hidrólise alcalina com e sem fortificação de MDA



Condições: BGE composto por 40 mmol L<sup>-1</sup> TRIS, 20 mmol L<sup>-1</sup> HCl, 2,5 mmol L<sup>-1</sup> CTAB (pH 8,0), temperatura do cartucho: 25 °C, voltagem: -28 kV, injeção hidrodinâmica: MDA (50 mbar por 5 s) seguida por BGE (25 mbar por 5 s) pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda: 266 nm, capilar TSP de 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo) x 50 µm de diâmetro interno x 375 µm diâmetro externo

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Comparando-se as Figuras 18, 25 e 26, embora o método otimizado não tenha conseguido detectar MDA livre, ele conseguiu detectar MDA total, que é a soma de MDA livre e MDA ligado. Sabe-se que apenas uma pequena porção de MDA em amostras biológicas está na forma livre, com a maior parte na forma ligada. Dessa forma, o MDA total é realmente maior que o MDA livre (Do Nascimento *et al.*, 2023).

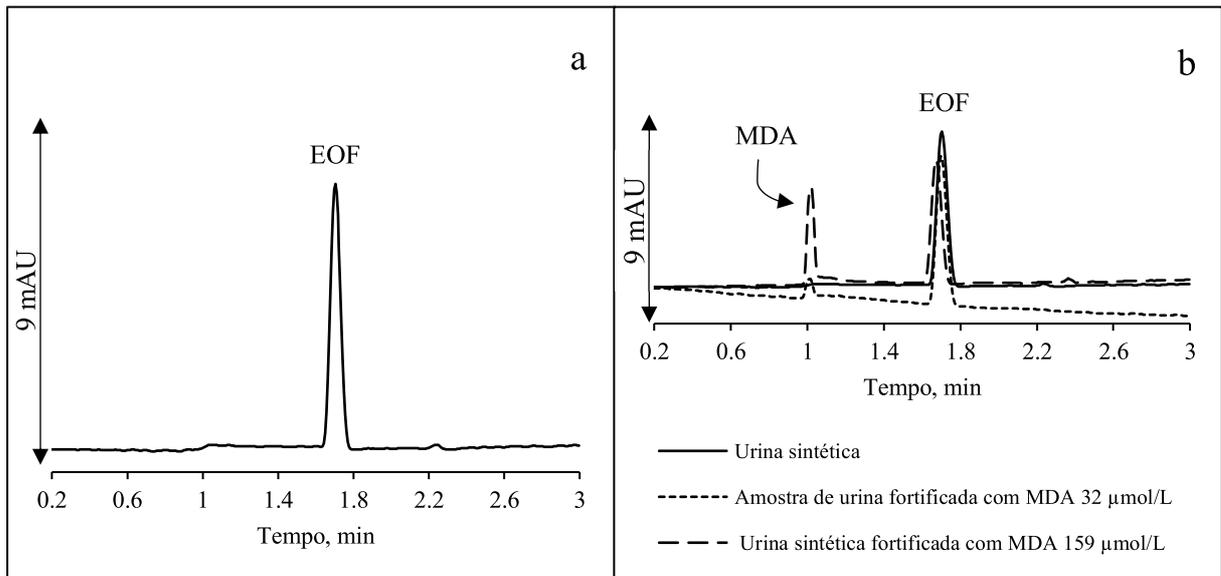
Uma amostra de urina sintética foi sintetizada de acordo com o protocolo descrito por Godoy e colaboradores (2020) e De Oliveira Moreira e colaboradores (2023). Esta amostra passou pelo processo de hidrólise alcalina conforme protocolo mostrado na Figura 12 e foi fortificada com MDA nas concentrações de 32 e 159 µmol L<sup>-1</sup>. Os eletroferogramas correspondentes são apresentados na Figura 27. O eletroferograma da matriz de urina sintética apresenta uma linha base estável e ausência do pico correspondente ao MDA (Figura 27). Ao fortificar a matriz de urina sintética com MDA em duas concentrações diferentes, observa-se um aumento no pico de MDA à medida que a concentração de MDA é elevada (Figura 27).

Além disso, o eletroferograma da urina sintética (Figura 27) e os eletroferogramas da urina real (Figuras 25 e 26) são semelhantes (De Oliveira Moreira *et al.*, 2023; Godoy; Eberlin; Simionato, 2020).

Figura 27 – Eletroferogramas da urina sintética submetida à hidrólise alcalina

a: Urina sintética

b: Urina sintética fortificada com diferentes concentrações de MDA



Condições: BGE composto por 40 mmol L<sup>-1</sup> TRIS, 20 mmol L<sup>-1</sup> HCl, 2,5 mmol L<sup>-1</sup> CTAB (pH 8,0), temperatura do cartucho: 25 °C, voltagem: -28 kV, injeção hidrodinâmica: MDA (50 mbar por 5 s) seguida por BGE (25 mbar por 5 s) pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda: 266 nm, capilar TSP de 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo) x 50 µm de diâmetro interno x 375 µm diâmetro externo

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Ao comparar o MDA na concentração de 32 µmol L<sup>-1</sup> em água (Figura 16) e na urina sintética fortificada com a mesma concentração de MDA (Figura 27b), a área do pico na primeira situação é de 3 mAU. Em contraste, na segunda situação, é de 1,8 mAU. Essa diminuição na área de MDA na presença de urina sintética demonstra o efeito de matriz que já era esperado, uma vez que o MDA interage com proteínas da matriz. Essa consideração é essencial para a etapa de validação do método, especialmente para a construção da curva de calibração (Do Nascimento *et al.*, 2023).

#### 4.6.2 Estratégias para monitoramento do MDA total nas amostras de plasma empregando CZE – UV

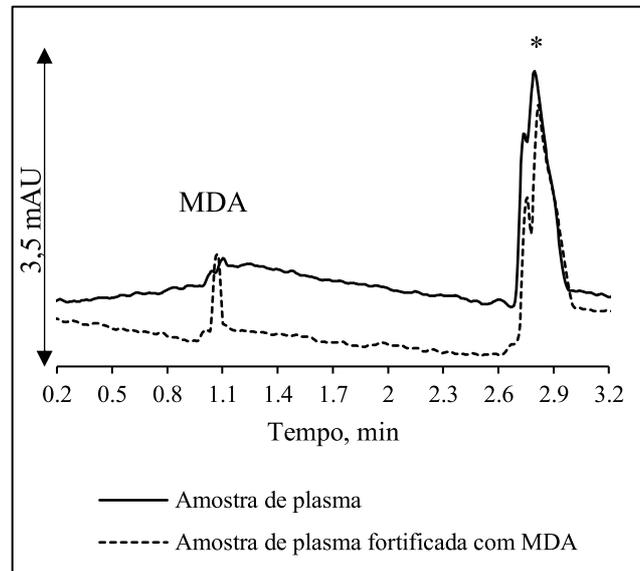
A detecção do MDA ligado demanda um tratamento hidrolítico da amostra em altas temperaturas para liberação da fração ligada do MDA em MDA livre. O tratamento da amostra de plasma para a determinação do MDA total seguiu o fluxograma da Figura 12 (mesmo procedimento para a determinação de MDA total em urina).

A Figura 28 mostra o eletroferograma da amostra de plasma submetida à hidrólise alcalina, com e sem fortificação com MDA a  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O eletroferograma da amostra de plasma submetida ao processo de hidrólise alcalina mostrou o pico correspondente ao MDA em 1,072 min e dois picos não identificados com comigração em cerca de 2,818 min. Ao fortificar a amostra de plasma com MDA na concentração de  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ , um pico correspondente ao MDA foi visualizado em 1,044 min, ausente no eletroferograma de plasma. Assim, o método otimizado não determinou MDA total em plasma.

Foram calculados o LOD e o LOQ do MDA total em plasma. Uma vez que no eletroferograma do MDA total na amostra de plasma, o sinal do MDA não foi detectado, o LOD e o LOQ foram estimados pelo eletroferograma da fortificação da amostra de plasma com MDA na concentração de  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Aplicando as Equações (14) e (15), o LOD calculado foi de  $0,51 \mu\text{mol L}^{-1}$  e o LOQ correspondeu a  $1,69 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Um artigo publicado por Grotto e colaboradores (2007) apresentou um estudo de estabilidade do MDA em plasma ao ser estocado à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  após reação de hidrólise alcalina com NaOH. Os resultados mostraram que o MDA se tornou instável nessa condição, havendo perda de MDA (cerca de 50%) após estoque por 24h. Por outro lado, a amostra derivatizada com TBA se manteve estável por 30 dias, ao ser estocada à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Essa falta de estabilidade do MDA ao passar pela hidrólise alcalina pode explicar a ausência de sinal de MDA nas amostras de plasma (Grotto *et al.*, 2007).

Figura 28 – Eletroferogramas da amostra de plasma submetida à hidrólise alcalina com e sem fortificação de MDA a  $32 \mu\text{mol L}^{-1}$



Condições: BGE composto por  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  TRIS,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  HCl,  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB (pH 8,0), temperatura do cartucho:  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , voltagem:  $-28 \text{ kV}$ , injeção hidrodinâmica: MDA ( $50 \text{ mbar}$  por  $5 \text{ s}$ ) seguida por BGE ( $25 \text{ mbar}$  por  $5 \text{ s}$ ) pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda:  $266 \text{ nm}$ , capilar TSP de  $48,5 \text{ cm}$  ( $40 \text{ cm}$  de comprimento efetivo) x  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno x  $375 \mu\text{m}$  diâmetro externo

\* Pico não identificado

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

#### 4.7 QUANTIFICAÇÃO DE MDA TOTAL EM AMOSTRAS DE URINA DE INDIVÍDUOS SUBMETIDOS AO TESTE DE COVID-19

As estratégias para monitoramento do MDA total nas amostras de urina empregando CZE – UV discutidas na seção 4.6.1 foram aplicadas para quantificar o MDA total em amostras de urina de indivíduos submetidos ao teste de COVID-19.

##### 4.7.1 Avaliação de algumas figuras de mérito

Duas curvas de calibração em cinco níveis de concentração, em triplicatas autênticas, foram construídas para quantificar o MDA total em amostras de urina. A primeira curva foi construída com o padrão de MDA em água. A segunda curva foi implementada com o padrão de MDA em urina sintética, ou seja, foi implementada uma curva de calibração por semelhança de matriz, conforme seção 3.9.

Dessa forma, soluções padrões de MDA em água ou urina sintética nas concentrações referentes aos cinco níveis foram injetados no equipamento de CE e obtidos os eletroferogramas correspondentes (seção 3.9). Após a integração dos picos referentes ao MDA e a obtenção das áreas, estas foram comparadas com suas concentrações. A Tabela 7 apresenta os valores das áreas dos picos usados para a implementação dos modelos e os valores de RSD para cada nível, em cada uma das curvas de calibração.

Tabela 7 – Valores de área utilizados para a implementação dos modelos de regressão linear

<b>Curva de calibração em água em triplicatas autênticas</b>					
<b>[MDA]</b> <b>(<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Sinal</b> <b>1ª replicata</b>	<b>Sinal</b> <b>2ª replicata</b>	<b>Sinal</b> <b>3ª replicata</b>	<b>Média <math>\pm</math></b> <b>desvio padrão*</b>	<b>RSD</b> <b>(%)</b>
11,4	1,3	1,3	1,2	1,27 $\pm$ 0,06	4,56
64,6	6,1	6,3	6,3	6,23 $\pm$ 0,12	1,85
12,0	11,2	11,7	11,2	11,37 $\pm$ 0,29	2,54
173,4	15,9	16,0	16,6	16,17 $\pm$ 0,38	2,34
226,1	21,5	21,4	21,8	21,57 $\pm$ 0,21	0,97
<b>Curva de calibração por semelhança de matriz em triplicatas autênticas</b>					
<b>[MDA]</b> <b>(<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Sinal</b> <b>1ª replicata</b>	<b>Sinal</b> <b>2ª replicata</b>	<b>Sinal</b> <b>3ª replicata</b>	<b>Média <math>\pm</math></b> <b>desvio padrão</b>	<b>RSD</b> <b>(%)</b>
27,2	1,5	1,5	1,5	1,50 $\pm$ 0,00	0,00
102,0	4,5	4,3	4,6	4,47 $\pm$ 0,15	3,42
176,8	7,6	7,2	7,6	7,47 $\pm$ 0,23	3,09
251,6	10,1	10,2	10,6	10,30 $\pm$ 0,26	2,57
324,7	13,1	12,8	12,7	12,7 $\pm$ 0,21	1,62

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Pela avaliação da Tabela 7, observou-se que as duas curvas de calibração apresentam RSD menor do que 5% em todos os níveis.

Esses modelos de previsão só podem ser utilizados corretamente se sua linearidade for verificada e ainda, se houver significância da regressão e não apresentarem falta de ajuste. Porém, antes disso é necessário verificar os pressupostos normalidade e homocedasticidade. Considerou-se que o pressuposto da independência já era atendido, pelo fato de as soluções utilizadas na implementação desses modelos terem sido preparadas de forma autêntica e a injeção no

equipamento de CE ter acontecido de forma aleatória. A Tabela 8 apresenta os resultados encontrados para esses pressupostos.

Tabela 8 – Pressupostos avaliados para a análise de variância

Curva de calibração	Normalidade		Homocedasticidade
	$W_{cal}$	$W_{tab}$	p-valor
Água	0,912	0,881	0,79
Curva de calibração por semelhança de matriz	0,912	0,881	0,754

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro – Wilk, em que a resposta obtida, chamada de  $W_{calculado}$  ( $W_{cal}$ ) deve ser maior do que o  $W_{tabelado}$  ( $W_{tab}$ ) para um dado intervalo de confiança. Como pode ser observado na Tabela 8, todos os valores de  $W_{cal}$  eram maiores do que os valores de  $W_{tab}$  para os respectivos intervalos de confiança considerados, assim esse pressuposto foi aceito e os dados estavam distribuídos de acordo com uma distribuição normal.

Já a homocedasticidade foi verificada através do *software* MiniTab14<sup>®</sup>, pelo teste de Levene. Pelos dados da Tabela 8, todos os valores eram maiores do que 0,05, de forma que esse pressuposto foi aceito e esses dados foram considerados homocedásticos.

Como os pressupostos não foram violados, a validade do modelo e a significância da estatística da curva ajustada podiam ser testados por meio da análise de variância. A Tabela 9 mostra o resultado final da análise de variância a 95% de confiança.

Tabela 9 – Dados utilizados para a análise de variância

Curva de calibração	Falta de ajuste		Significância da regressão	
	$F_{cal}$	$F_{\vartheta_{faj}, \vartheta_{ep}}$	$F_{cal}$	$F_{\vartheta_{reg}, \vartheta_r}$
Água	1,905	3,71	11051	4,67
Curva de calibração por semelhança de matriz	1,470	3,71	5814	4,67

$$F_{tab} = F_{\vartheta_{faj}, \vartheta_{ep}} = F_{3, 10} \text{ e } F_{tab} = F_{\vartheta_{reg}, \vartheta_r} = F_{1, 13}$$

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Avaliando os dados da Tabela 9, o valor de  $F_{calculado}$  ( $F_{cal}$ ) no teste da falta de ajuste foi menor do que o  $F_{tabelado}$  ( $F_{tab}$ ) para as duas curvas implementadas, afirmando-se então que, com

95% de confiança, não houve evidência de falta de ajuste nos modelos implementados. No caso do teste de significância da regressão, o  $F_{cal}$  foi mais de cinco vezes maior do que o  $F_{tab}$ , também nas duas curvas, mostrando que os modelos apresentavam regressões significativas.

Os modelos de regressão implementados são mostrados na Tabela 10, assim como o coeficiente de correlação determinado para cada modelo.

Tabela 10 – Resultados estatísticos para os modelos de previsão

<b>Curva de calibração</b>	<b>Modelo de regressão</b>	<b>Coefficiente de correlação</b>
<b>Água</b>	$y (\pm 0,2633) = 0,0939 (\pm 0,0009) x + 0,1386 (\pm 0,1262)$	0,999
<b>Curva de calibração por semelhança de matriz</b>	$y (\pm 0,2052) = 0,0384 (\pm 0,0005) x + 0,5493 (\pm 0,1034)$	0,999

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A Tabela 10 mostra que em todas as curvas implementadas, o valor do coeficiente de correlação era próximo de 1,0, mostrando a relação linear existente entre as variáveis  $y$  e  $x$ , correspondente a área e concentração, respectivamente.

O MDA interage com proteínas da urina, havendo um efeito de matriz sobre o MDA. Portanto, uma curva de calibração em água não é interessante porque o efeito da matriz sobre o analito na amostra não é considerado. Para confirmar esta questão, a recuperação do MDA foi calculada considerando o padrão de MDA em água, como visto na Tabela 11. Para isso, a recuperação foi investigada pela fortificação do QC com o analito em três níveis de concentração: o primeiro nível da curva de calibração ( $11,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), o nível intermediário da curva ( $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e o nível mais alto ( $226,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Os testes foram realizados em triplicatas autênticas de acordo com a Equação (13).

Tabela 11 – Teste de recuperação considerando o padrão de MDA em água

<b>Recuperação (%)<sup>*</sup></b>		
<b>Nível 1<sup>a</sup></b>	<b>Nível 2<sup>b</sup></b>	<b>Nível 3<sup>c</sup></b>
44,85 ± 36,93	50,18 ± 3,57	51,11 ± 8,99

<sup>\*</sup> Triplicatas autênticas

<sup>a</sup> Nível 1: 11,4 µmol L<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> Nível 2: 120 µmol L<sup>-1</sup>

<sup>c</sup> Nível 3: 226,1 µmol L<sup>-1</sup>

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Na Tabela 11, é possível observar a baixa recuperação devido à interação do MDA com proteínas da urina, havendo um efeito de matriz sobre o MDA. Portanto, implementar uma curva de calibração com o padrão de MDA em água não é o ideal porque subestima os resultados de concentração de MDA. Além disso, o alto RSD obtido nesse teste pode ter sido causado por algum erro aleatório durante o processo de preparo de amostras entre as réplicas ou durante as análises, visto que o preparo de amostras e a análise no equipamento de CE ocorreram em triplicatas autênticas. Antunes e colaboradores (2008) encontraram um resultado semelhante ao analisar MDA em plasma. Assim, o MDA foi quantificado nas amostras de urina implementando a curva de calibração por semelhança de matriz (Antunes *et al.*, 2008; Do Nascimento *et al.*, 2022).

A repetibilidade foi estimada pela precisão intradia e interdia. A precisão intradia foi calculada a partir de seis injeções autênticas de QC em um mesmo dia, enquanto a precisão interdia considerou doze injeções autênticas de QC em dois dias diferentes. Os valores de RSD para a área do pico e para o tempo de migração do MDA são apresentados na Tabela 12. De acordo com a diretriz M10 do Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH, do inglês *The International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) sobre validação de métodos bioanalíticos e análise de amostras de estudo, o RSD não deve exceder 15%, o que foi atendido pelo método (European Medicines Agency, 2022; Wang *et al.*, 2018).

Tabela 12 – RSD para o teste de repetibilidade

<b>Precisão</b>	<b>Área de sinal</b>	<b>Tempo de migração</b>
<b>Intradia<sup>*</sup></b>	4,37%	1,43%
<b>Interdia<sup>**</sup></b>	6,20%	0,97%

<sup>\*</sup> n = 6

<sup>\*\*</sup> n = 12

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A Tabela 13 mostra os resultados dos seguintes testes de validação: LOD, LOQ e recuperação. Esses testes foram realizados no QC.

Tabela 13 – Resultados para os testes de validação LOD, LOQ e recuperação

LOD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Recuperação (%)		
		Nível 1*	Nível 2**	Nível 3***
3,45	11,50	97,92 $\pm$ 3,69	98,18 $\pm$ 1,68	100,23 $\pm$ 4,22

\* Nível 1: 27,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$

\*\* Nível 2: 176,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$

\*\*\* Nível 3: 324,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O LOD corresponde à menor concentração do analito que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, enquanto o LOQ representa a menor concentração que pode ser quantificada usando um determinado método. Salienta-se que os dois parâmetros foram medidos usando a relação sinal – ruído, de acordo com as Equações (14) e (15), respectivamente. De acordo com os dados da Tabela 13, foram encontrados valores de LOD e LOQ de 3,45  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 11,50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, sendo que o primeiro nível da curva de calibração implementada foi superior ao LOQ determinado.

Os ensaios de recuperação foram realizados pela fortificação do QC com soluções de MDA em três níveis de concentração: o primeiro nível da curva de calibração por semelhança de matriz (27,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), o nível intermediário da curva (176,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e o nível mais elevado (324,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Os testes foram realizados em triplicatas autênticas de acordo com a Equação (13). De acordo com a diretriz M10 do ICH sobre validação de métodos bioanalíticos e análise de amostras de estudo, a recuperação do analito não precisa ser 100% desde que apresente um desvio aceitável, o que foi atendido pelo método conforme Tabela 13 (De Oliveira Moreira *et al.*, 2023; European Medicines Agency, 2022).

#### 4.7.2 Quantificação de MDA total nas amostras de urina

O MDA total foi quantificado em 75 amostras de urina, em triplicatas autênticas e aleatoriamente, usando a curva de calibração por semelhança de matriz, descrita na seção 4.7.1 e a preparação da amostra descrita na Figura 12. Para isso, injetou-se as amostras sob as condições otimizadas e após a integração do pico correspondente ao MDA, a área resultante foi

usada na curva de calibração por semelhança de matriz para obter a concentração correspondente ao analito. Os resultados são apresentados na Tabela 14.

Na determinação de biomarcadores em urina, costuma-se realizar a normalização dos resultados com creatinina urinária (uCrn, do inglês *urinary creatinine*) com o objetivo de evitar a superestimação do analito. Assim, a concentração de MDA encontrada nas amostras de urina foi padronizada com uCrn, conforme mostrado na Tabela 14. Os valores de uCrn utilizados neste trabalho foram previamente determinados no artigo de De Oliveira Moreira e colaboradores (2023) em um método que determinou com sucesso uCrn em amostras de urina por Eletroforese Capilar como uma alternativa ao método tradicional baseado na reação de Jaffe. Das 75 amostras de urina consideradas, 8 não puderam ter a uCrn registradas, como mostrado na Tabela 14 (De Oliveira Moreira *et al.*, 2023).

Tabela 14 – Resultados para a quantificação de MDA total nas amostras de urina

<b>Amostra de urina</b>	<b>[MDA] (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>[uCrn] (<math>\text{mg dL}^{-1}</math>)</b>	<b>[MDA/uCrn] (<math>\text{mg g}^{-1}</math>)</b>	<b>Amostra de urina</b>	<b>[MDA] (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>[uCrn] (<math>\text{mg dL}^{-1}</math>)</b>	<b>[MDA/uCrn] (<math>\text{mg g}^{-1}</math>)</b>
<b>1</b>	181,01 $\pm$ 9,02	4,98	248,77	5,24	<b>39</b>	163,65 $\pm$ 1,50	0,92	155,05	7,61
<b>2</b>	27,36 $\pm$ 0,00	0,00	22,36	8,82	<b>40</b>	118,51 $\pm$ 5,21	4,39	272,04	3,14
<b>3</b>	20,42 $\pm$ 1,50	7,36	48,68	3,02	<b>41</b>	72,50 $\pm$ 3,98	5,49	370,27	1,41
<b>4</b>	186,22 $\pm$ 2,60	1,40	189,21	7,09	<b>42</b>	61,22 $\pm$ 2,60	4,25	33,40	13,21
<b>5</b>	252,19 $\pm$ 13,36	5,30	-	-	<b>43</b>	34,31 $\pm$ 1,50	4,38	33,70	7,34
<b>6</b>	292,12 $\pm$ 10,84	3,71	428,18	4,92	<b>44</b>	28,23 $\pm$ 1,50	5,33	95,56	2,13
<b>7</b>	108,09 $\pm$ 2,60	2,41	-	-	<b>45</b>	76,84 $\pm$ 2,60	3,39	204,46	2,71
<b>8</b>	94,20 $\pm$ 1,50	1,60	94,55	7,18	<b>46</b>	285,17 $\pm$ 4,51	1,58	36,36	56,52
<b>9</b>	76,84 $\pm$ 2,60	3,39	178,80	3,10	<b>47</b>	152,36 $\pm$ 2,60	1,71	122,96	8,93
<b>10</b>	141,95 $\pm$ 6,89	4,85	68,11	15,02	<b>48</b>	132,40 $\pm$ 7,96	6,01	153,85	6,20
<b>11</b>	274,76 $\pm$ 2,60	0,95	309,52	6,40	<b>49</b>	331,18 $\pm$ 7,52	2,27	-	-
<b>12</b>	312,08 $\pm$ 7,96	2,55	-	-	<b>50</b>	157,57 $\pm$ 7,81	4,96	190,58	5,96
<b>13</b>	73,37 $\pm$ 3,98	5,42	151,51	3,49	<b>51</b>	131,53 $\pm$ 6,89	5,24	409,01	2,32
<b>14</b>	75,11 $\pm$ 3,98	5,30	88,54	6,11	<b>52</b>	146,29 $\pm$ 3,98	2,72	169,58	6,22
<b>15</b>	160,17 $\pm$ 4,51	2,82	-	-	<b>53</b>	93,33 $\pm$ 3,01	3,22	332,50	2,02
<b>16</b>	35,17 $\pm$ 0,00	0,00	19,57	12,95	<b>54</b>	373,72 $\pm$ 16,26	4,35	111,16	24,23
<b>17</b>	94,20 $\pm$ 3,98	4,22	74,96	9,06	<b>55</b>	110,70 $\pm$ 5,21	4,71	74,86	10,66
<b>18</b>	38,65 $\pm$ 1,50	3,89	50,53	5,51	<b>56</b>	23,89 $\pm$ 1,50	6,29	82,91	2,08

<b>19</b>	36,04 ± 1,50	4,17	57,07	4,55	<b>57</b>	227,88 ± 2,60	1,14	116,88	14,05
<b>20</b>	123,72 ± 6,89	5,57	131,25	6,79	<b>58</b>	110,70 ± 5,21	4,71	-	-
<b>21</b>	50,80 ± 2,60	5,13	45,32	8,08	<b>59</b>	126,32 ± 6,89	5,45	97,26	9,36
<b>22</b>	82,92 ± 1,50	1,81	179,87	3,32	<b>60</b>	77,71 ± 3,01	3,87	-	-
<b>23</b>	136,74 ± 6,89	5,04	165,82	5,94	<b>61</b>	107,22 ± 3,98	3,71	212,79	3,63
<b>24</b>	88,99 ± 1,50	1,69	91,09	7,04	<b>62</b>	182,74 ± 1,50	0,82	35,32	37,28
<b>25</b>	206,18 ± 10,84	5,26	185,63	8,00	<b>63</b>	169,72 ± 6,01	3,54	123,16	9,93
<b>26</b>	208,79 ± 9,15	4,38	112,31	13,40	<b>64</b>	266,95 ± 7,81	2,93	169,69	11,34
<b>27</b>	53,40 ± 2,60	4,88	229,11	1,68	<b>65</b>	124,58 ± 3,01	2,41	-	-
<b>28</b>	240,04 ± 9,15	3,81	80,56	21,47	<b>66</b>	148,02 ± 1,50	1,02	161,22	6,62
<b>29</b>	75,97 ± 3,98	5,24	307,84	1,78	<b>67</b>	246,98 ± 10,84	4,39	112,64	15,80
<b>30</b>	228,75 ± 12,31	5,38	109,28	15,08	<b>68</b>	62,08 ± 3,98	6,41	54,13	8,26
<b>31</b>	75,11 ± 3,98	5,30	134,98	4,01	<b>69</b>	167,12 ± 9,86	5,90	207,07	5,82
<b>32</b>	165,38 ± 4,51	2,73	73,31	16,26	<b>70</b>	160,17 ± 2,60	1,63	51,33	22,49
<b>33</b>	76,84 ± 2,60	3,39	270,29	2,05	<b>71</b>	180,14 ± 6,01	3,34	156,23	8,31
<b>34</b>	206,18 ± 1,50	0,73	123,45	12,04	<b>72</b>	134,13 ± 6,89	5,14	151,27	6,39
<b>35</b>	88,13 ± 3,01	3,41	231,19	2,75	<b>73</b>	152,36 ± 0,00	0,00	288,98	3,80
<b>36</b>	246,98 ± 6,55	2,65	63,56	28,00	<b>74</b>	224,41 ± 10,52	4,69	211,89	7,63
<b>37</b>	384,13 ± 6,89	1,79	320,89	8,63	<b>75</b>	27,36 ± 0,00	0,00	229,73	0,86
<b>38</b>	95,07 ± 2,60	2,74	300,65	2,28					

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Observando-se os dados da Tabela 14, percebeu-se os valores elevados de MDA em relação a trabalhos encontrados na literatura. De acordo com Cui e colaboradores (2018) o teor de MDA total em urina de adultos da China, Reino Unido e Estados Unidos da América se encontram na faixa de 3,8 a 13,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Cui *et al.*, 2018).

De forma a explicar a alta concentração de MDA obtida nessas análises e encontrar a origem do erro associado, foi feita a avaliação novamente de todos os dados e eletroferogramas obtidos durante o trabalho.

Fez-se a comparação das Figuras 18 e 25, que correspondem aos eletroferogramas do MDA livre e do MDA total da amostra de urina, respectivamente. Na Figura 18, ao se realizar a fortificação da amostra de urina com a solução de MDA, havia um pico em torno de 1,2 min (próximo ao pico do MDA). Acredita-se, inclusive, que este influenciou na tentativa sem sucesso de realização da pré-concentração do MDA utilizando-se a FASI (Figura 22). Na Figura 25, porém, esse pico não foi observado. Além disso, o pico do MDA não retornou de forma adequada à linha base.

Inicialmente, esses fatores não foram considerados preocupantes devido a fortificação da amostra de urina com solução de MDA mostrar aumento do sinal do analito. Associado a isso, os valores de recuperação obtidos se encontravam em uma faixa adequada. Porém, uma análise cuidadosa posterior mostrou que esses fatores eram um indício da necessidade de aperfeiçoamento do método.

O artigo publicado por Grotto e colaboradores (2007) mostrou que o MDA em plasma se tornou instável ao ser estocado à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  após reação de hidrólise alcalina com NaOH, com perda de 50% após estoque por 24h. Além disso, o MDA era estável quando estocado após derivatização com o TBA. Ao ser extraído com n-butanol, o MDA derivatizado com TBA se manteve estável por 3 dias, quando estocado à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No mesmo trabalho, o MDA foi determinado em amostras de plasma por HPLC – Vis após derivatização com TBA e extração com n-butanol. Essa extração é realizada para diminuir interferentes da análise. Apesar de considerar uma matriz biológica diferente, que é o plasma, esses resultados são um indício de que os resultados elevados de MDA encontrados nas amostras de urina podem ter relação com o preparo de amostras, de forma que a realização de um estudo envolvendo o tratamento de amostras é necessário (Grotto *et al.*, 2007).

Nesse contexto, os seguintes estudos poderiam ser realizados, os quais auxiliariam no entendimento dos altos valores de MDA encontrados nas amostras de urina e promoveriam o aperfeiçoamento do método: um estudo de estabilidade do MDA em urina após hidrólise alcalina com NaOH semelhante ao realizado por Grotto e colaboradores (2007) para amostras

de plasma, medição do MDA total das amostras de urina pelo método TBARS, que é o método mais utilizado para essa finalidade e que se baseia na reação de derivatização com TBA e extração do MDA após hidrólise alcalina com um solvente como o n-butanol, para evitar a influência de interferentes (Grotto *et al.*, 2007).

## 5 CONCLUSÕES

O MDA é o biomarcador mais utilizado da peroxidação lipídica, sendo essencial o desenvolvimento de métodos seletivos, confiáveis e rápidos para a sua determinação em amostras biológicas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e otimização de um método por CE para a determinação do biomarcador MDA em amostras de urina de indivíduos submetidos ao teste de COVID-19 e em amostras de plasma de indivíduos sob suplementação de ômega 3.

Para isso, a mobilidade eletroforética do MDA foi determinada pela primeira vez. Esse dado se mostrou de suma importância para o desenvolvimento e otimização de método para determinação de MDA em amostras de plasma e urina por CE, pois viabilizou a especificação das condições experimentais mais adequadas para a análise a partir da implementação de curva de mobilidade efetiva x pH em conjunto com simulação no *software* PeakMaster®.

Com as melhores condições otimizadas pelo *software* PeakMaster®, que foram BGE composto por 40 mmol L<sup>-1</sup> de TRIS, 20 mmol L<sup>-1</sup> de HCl, 2,5 mmol L<sup>-1</sup> de CTAB (pH 8,0), voltagem de -28 kV e capilar com comprimento total de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo) foi possível obter um pico de MDA em cerca de 1 min, de forma que este seria o método para determinação de MDA em amostras biológicas por Eletroforese Capilar (CE) com o menor tempo de migração já desenvolvido.

Para a determinação de MDA livre, as amostras de urina e plasma passaram por um processo de precipitação de proteínas com ACN à frio. Ao injetar as soluções no equipamento de CE, não foi possível detectar sinal do MDA nas amostras de plasma e urina. A fortificação das amostras com MDA permitiu o cálculo do LOD e do LOQ. Para a determinação do MDA livre em urina o LOD calculado foi de 1,27 µmol L<sup>-1</sup> e o LOQ correspondeu a 4,25 µmol L<sup>-1</sup>. Já para a determinação de MDA livre em plasma, o LOD mensurado foi de 1,97 µmol L<sup>-1</sup> e o LOQ correspondeu a 6,56 µmol L<sup>-1</sup>.

Objetivando-se detectar o MDA livre nas amostras, implementou-se uma pré-concentração *on-line* do analito utilizando a técnica FASI, que se baseia na injeção eletrocínica de amostra, ou seja, introdução de amostra no capilar com aplicação de voltagem por um tempo definido. A otimização da FASI foi realizada pela aplicação de um planejamento de experimentos Box-Behnken, na qual os fatores avaliados foram a concentração do BGE, a voltagem aplicada durante a injeção eletrocínica e o tempo da injeção eletrocínica. A partir da análise das respostas desse planejamento e de um teste de repetibilidade, o ensaio A cujas condições são BGE composto por 40 mmol L<sup>-1</sup> TRIS, 20 mmol L<sup>-1</sup> HCl e 2,5 mmol L<sup>-1</sup> CTAB

(pH 8,0) e injeção eletrocínética com aplicação de -10 kV de voltagem por 60 s foi considerado o mais adequado. Porém, ao aplicar essas condições nas amostras de urina e plasma para a determinação de MDA livre, não foi possível detectar o sinal do MDA.

Para a determinação do MDA total nas amostras de plasma, foi feita a liberação do MDA ligado em MDA livre por um processo de hidrólise alcalina. Porém, não foi possível detectar nenhum sinal do MDA. A partir da fortificação da amostra com o analito, foi possível estimar o LOD em  $0,51 \mu\text{mol L}^{-1}$  e o LOQ em  $1,69 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Para a determinação do MDA total nas amostras de urina, utilizou-se o mesmo tratamento hidrolítico da amostra de plasma. A princípio foi possível detectar o sinal do MDA, o qual foi confirmado fortificando-se a amostra com uma solução de MDA. Duas curvas de calibração foram construídas, uma em água e uma curva de calibração por semelhança de matriz. Concluiu-se que para contornar o efeito de matriz causado pela interação do MDA com as proteínas da urina, seria mais adequado a quantificação de MDA total pela implementação de uma curva de calibração por semelhança de matriz.

O MDA total foi quantificado em 75 amostras de urina de indivíduos submetidos ao teste de COVID-19, sendo esses valores normalizados com a creatinina urinária. Porém, as concentrações de MDA estavam muito elevadas em relação a trabalhos encontrados na literatura. Acredita-se que esse fato tenha relação com o preparo de amostras.

Dessa forma, os seguintes estudos poderiam ser realizados, os quais auxiliariam no entendimento dos altos valores de MDA encontrados nas amostras de urina e promoveriam o aperfeiçoamento do método: um estudo de estabilidade do MDA em urina após hidrólise alcalina com NaOH, medição do MDA total das amostras de urina pelo método TBARS, que é o método mais utilizado para essa finalidade e que se baseia na reação de derivatização com TBA e extração do MDA após hidrólise alcalina com um solvente como o n-butanol, para evitar a influência de interferentes.

## REFERÊNCIAS

- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, [s. l.], v. 127, n. 1, p. 183–198, 2002.
- ANTUNES, M. V.; LAZZARETTI, C.; GAMARO, G. D.; LINDEN, R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 279–287, 2008.
- AVILA-NAVA, A.; PECH-AGUILAR, A. G.; LUGO, R.; MEDINA-VERA, I.; GUEVARA-CRUZ, M.; GUTIÉRREZ-SOLIS, A. L. Oxidative Stress Biomarkers and Their Association with Mortality among Patients Infected with SARS-CoV-2 in Mexico. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [s. l.], v. 2022, p. 1–8, 2022.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [s. l.], v. 2014, p. 1–31, 2014.
- AZHAR, E. I.; VELAVAN, T. P.; RUNGSUNG, I.; TRAORE, T.; HUI, D. S.; MCCLOSKEY, B.; EL-KAFRAWY, S. A.; ZUMLA, A. Middle East respiratory syndrome coronavirus—a 10-year (2012-2022) global analysis of human and camel infections, genomic sequences, lineages, and geographical origins. *International Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 131, p. 87–94, 2023.
- BAKER, D. *Capillary Electrophoresis*. 1. ed. [s. l.]: Wiley-Interscience, 1995.
- BAÑOS, C. E.; SILVA, M. A novel clean-up method for urine analysis of low-molecular mass aldehydes by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, [s. l.], v. 879, n. 17–18, p. 1412–1418, 2011.
- BIONDI, R.; BRANCORSINI, S.; EGIDI, M. G.; POLI, G.; CAPODICASA, E.; TRITTO, I.; CARLO, G.; DI RENZO, G. C.; DUICA, F.; CRETOIU, D.; SUCIU, N. Free and Total Malondialdehyde Measured as 2, 4-dinitrophenylhydrazine Adduct by HPLC-UV in Hemodialysis Patient Serum. *Journal of Clinical Chemistry and and Laboratory Medicine*, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–9, 2019.
- BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 288–298, 2019.
- BOUATRA, S.; AZIAT, F.; MANDAL, R.; GUO, A. C.; WILSON, M. R.; KNOX, C.; BJORND AHL, T. C.; KRISHNAMURTHY, R.; SALEEM, F.; LIU, P.; DAME, Z. T.; POELZER, J.; HUYNH, J.; YALLOU, F. S.; PSYCHOGIOS, N.; DONG, E.; BOGUMIL, R.; ROEHRING, C.; WISHART, D. S. The Human Urine Metabolome. *PLOS One*, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1–8, 2013.
- CHANGO, G.; GARCÍA-GÓMEZ, D.; GARCÍA PINTO, C.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; PÉREZ PAVÓN, J. L. Rapid and reliable quantification of urinary malondialdehyde by

HILIC-MS/MS: A derivatization-free breakthrough approach. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1311, p. 342737, 2024.

CHERRY, J. D.; KROGSTAD, P. SARS: The First Pandemic of the 21st Century. **Pediatric Research**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 1–5, 2004.

CLAESON, K.; ABERG, F.; KARLBERG, B. Free malondialdehyde determination in rat brain tissue by capillary zone electrophoresis: evaluation of two protein removal procedures. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 740, p. 87–92, 2000.

COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por Eletroforese Capilar: Características e aplicações. **Química Nova**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 512–518, 1997.

COOLEY, J. C.; LUNTE, C. E. Detection of malondialdehyde in vivo using microdialysis sampling with CE-fluorescence. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 32, p. 2994–2999, 2011.

CUI, X.; GONG, J.; HAN, H.; HE, L.; TENG, Y.; TETLEY, T.; SINHARAY, R.; CHUNG, K. F.; ISLAM, T.; GILLILAND, F.; GRADY, S.; GARSHICK, E.; LI, Z.; ZHANG, J. Relationship between free and total malondialdehyde, a well-established marker of oxidative stress, in various types of human biospecimens. **Journal of Thoracic Disease**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 3088–3197, 2018.

CUSTODIO-MENDOZA, J. A.; VALENTE, I. M.; RAMOS, R. M.; LORENZO, R. A.; CARRO, A. M.; RODRIGUES, J. A. Analysis of free malondialdehyde in edible oils using gas-diffusion microextraction. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 82, p. 103254, 2019.

DE OLIVEIRA MOREIRA, O. B.; CASTRO, L. dos A.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Calculation and preparation of buffer solutions: complete guide using the software Peakmaster®. **Química Nova**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 783–791, 2021.

DE OLIVEIRA MOREIRA, O. B.; QUEIROZ DE SOUZA, J. C.; BERALDO CANDIDO, J. M.; DO NASCIMENTO, M. P.; CHELLINI, P. R.; DE LEMOS, L. M.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Determination of creatinine in urine and blood serum human samples by CZE-UV using on-column internal standard injection. **Talanta**, [s. l.], v. 258, p. 124465, 2023.

DE VECCHI, A. F.; BAMONTI, F.; NOVEMBRINO, C.; IPPOLITO, S.; GUERRA, L.; LONATI, S.; SALINI, S.; AMAN, C. S.; SCURATI-MANZONI, E.; CIGHETTI, G. Free and total plasma malondialdehyde in chronic renal insufficiency and in dialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [s. l.], v. 24, p. 2524–2529, 2009.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 316–328, 2005.

DO NASCIMENTO, M. P.; MARCHIORI BERLANDE, B.; GUEDES FRAGA LOPES, M.; CARDOSO DE LIMA, M. F.; TEODORO DE SOUZA, C.; LEAL DE OLIVEIRA, M. A. Malondialdehyde Analysis in Biological Samples by Capillary Electrophoresis: The State of Art. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, [s. l.], p. 1–13, 2023.

DO NASCIMENTO, M. P.; MARQUES, R.; PEREIRA, M. P.; MARTINS, R. de S.; IRENE BOMBONATO, F.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Determination of purity and anionic exchange efficiency of amino acid ionic liquids synthesis by multiple-injection capillary zone electrophoresis. **Talanta**, [s. l.], v. 237, p. 122945, 2022.

DOMIJAN, A. M.; RALIĆ, J.; RADIĆ BRKANAC, S.; RUMORA, L.; ŽANIĆ-GRUBIŠIĆ, T. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples. **Biomedical Chromatography**, [s. l.], v. 29, p. 41–46, 2015.

DONG, X.; TANG, J.; CHEN, X. Sensitive determination of malondialdehyde in rat prostate by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, p. 1–7, 2020.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 186, p. 421–431, 1990.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, [s. l.], v. 11, p. 81–128, 1991.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis, 2022. Disponível em: [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact).

FARIA, A. F.; N DE SOUZA, M. V.; L DE OLIVEIRA, M. A.; BRAZ CHEM SOC, J. Validation of a Capillary Zone Electrophoresis Method for the Determination of Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin and Ofloxacin in Pharmaceutical Formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 389–396, 2008.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 597, n. 2, p. 179–186, 2007.

FRACASSI DA SILVA, J. A.; KARLOS, W.; COLTRO, T.; CARRILHO, E.; FRANCO, M.; TAVARES, M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 740–744, 2007.

GAO, F.; CHEN, X.; LI, X.; LI, J.; LIU, H.; CHEN, L. Field-amplified sample injection combined with capillary electrophoresis for the simultaneous determination of five chlorophenols in water samples. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 40, p. 1771–1778, 2019.

GEORGAKOPOULOS, C. D.; LAMARI, F. N.; KARATHANASOPOULOU, I. N.; GARTAGANIS, V. S.; PHARMAKAKIS, N. M.; KARAMANOS, N. K. Tear analysis of ascorbic acid, uric acid and malondialdehyde with capillary electrophoresis. **Biomedical Chromatography**, [s. l.], v. 24, p. 852–857, 2010.

GIERA, M.; LINGEMAN, H.; NIESSEN, W. M. A. Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): A brief overview. **Chromatographia**, [s. l.], v. 75, p. 433–440, 2012.

GINTER, E.; SIMKO, V. Type 2 Diabetes Mellitus, pandemic in 21st century. *In*: AHMAD, S. I. (Ed.). **Diabetes. Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York: Springer, 2013, v. 771, p. 42–50.

GODOY, A. T.; EBERLIN, M. N.; SIMIONATO, A. V. C. Targeted metabolomics: Liquid chromatography coupled to mass spectrometry method development and validation for the identification and quantitation of modified nucleosides as putative cancer biomarkers. **Talanta**, [s. l.], v. 210, 2020.

GROTTO, D.; SANTA MARIA, L. D.; BOEIRA, S.; VALENTINI, J.; CHARÃO, M. F.; MORO, A. M.; NASCIMENTO, P. C.; POMBLUM, V. J.; GARCIA, S. C. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 43, p. 619–624, 2007.

GROTTO, D.; SANTA MARIA, L.; VALENTINI, J.; PANIZ, C.; SCHMITT, G.; GARCIA, S. C. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Química Nova**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 169–174, 2009.

HUANG, Y.; CHEN, H.; LIU, Q.; HU, J.; HU, D.; HUANG, Z.; XU, Z.; WAN, R. Obesity difference on association blood malondialdehyde level and diastolic hypertension in the elderly population: a cross-sectional analysis. **European Journal of Medical Research**, [s. l.], v. 28, n. 44, p. 1–8, 2023.

IDF. **Facts & figures**. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://idf.org/about-diabetes/diabetes-facts-figures/>. Acesso em: 16 jan. 2025.

IDF DIABETES ATLAS. **Diabetes around the world in 2021**. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/>. Acesso em: 16 jan. 2025.

JÎTCĂ, G.; FOGARASI, E.; ÓSZ, B. E.; VARI, C. E.; TERO-VESCAN, A.; MIKLOS, A.; BĂTRÎNU, M. G.; RUSZ, C. M.; CROITORU, M. D.; DOGARU, M. T. A Simple HPLC/DAD Method Validation for the Quantification of Malondialdehyde in Rodent's Brain. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 16, p. 1–10, 2021.

JOVÉ, M.; MOTA-MARTORELL, N.; PAMPLONA, R.; PRADAS, I.; MARTÍN-GARI, M.; AYALA, V. The advanced lipoxidation end-product malondialdehyde-lysine in aging and longevity. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 1132, p. 1–20, 2020.

KARTAVENKA, K.; PANUWET, P.; YAKIMAVETS, V.; JAIKANG, C.; THIPUBON, K.; D'SOUZA, P. E.; BARR, D. B.; RYAN, P. B. LC-MS quantification of malondialdehyde-dansylhydrazine derivatives in urine and serum samples. **Journal of Analytical Toxicology**, [s. l.], v. 44, p. 470–481, 2020.

KITAGAWA, F.; OTSUKA, K. Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1335, p. 43–60, 2014.

KORIZIS, K. N.; EXARCHOU, A.; MICHALOPOULOS, E.; GEORGAKOPOULOS, C. D.; KOLONITSIOU, F.; MANTAGOS, S.; GARTAGANIS, S. P.; KARAMANOS, N. K.

Determination of malondialdehyde by capillary electrophoresis, application to human plasma and relation of its levels with prematurity. **Biomedical Chromatography**, [s. l.], v. 15, p. 287–291, 2001.

KRIVÁCSY, Z.; GELENCSÉR, A.; HLAVAY, J.; KISS, G.; SÁRVÁRI, Z. Electrokinetic injection in capillary electrophoresis and its application to the analysis of inorganic compounds. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 834, p. 21–44, 1999.

LABARINAS, S.; ARNI, D.; KARAM, O. Plasma in the PICU: Why and when should we transfuse? **Annals of Intensive Care**, [s. l.], v. 3, n. 16, p. 1–7, 2013.

LAMERS, M. M.; HAAGMANS, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 270–284, 2022.

LIMA, M. F. C. **Efeitos da suplementação de óleo de peixe na inflamação subclínica e resistência insulínica em indivíduos com excesso de peso resistentes à insulina**. 2024. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2024.

MA, L.; HE, Q.; QIU, Y.; LIU, H.; WU, J.; LIU, G.; BRENNAN, C.; BRENNAN, M. A.; ZHU, L. Food matrixes play a key role in the distribution of contaminants of lipid origin: A case study of malondialdehyde formation in vegetable oils during deep-frying. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 347, p. 129080, 2021.

MARSEGLIA, L.; MANTI, S.; D'ANGELO, G.; NICOTERA, A.; PARISI, E.; DI ROSA, G.; GITTO, E.; ARRIGO, T. Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 378–400, 2015.

MAS-BARGUES, C.; ESCRIVÁ, C.; DROMANT, M.; BORRÁS, C.; VIÑA, J. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 709, p. 108941, 2021.

MEHRI, F.; RAHBAR, A. H.; GHANE, E. T.; SOURI, B.; ESFAHANI, M. Changes in oxidative markers in COVID-19 patients. **Archives of Medical Research**, [s. l.], v. 52, n. 8, p. 843–849, 2021.

MENDONÇA, R.; GNING, O.; DI CESARÉ, C.; LACHAT, L.; BENNETT, N. C.; HELFENSTEIN, F.; GLAUSER, G. Sensitive and selective quantification of free and total malondialdehyde in plasma using UHPLC-HRMS. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 58, n. 9, p. 1924–1931, 2017.

MOREIRA, O. B. de O. **Desenvolvimento e otimização de estratégias analíticas visando o diagnóstico de covid-19 em amostras de urina**. 2024. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2024.

MOREIRA, O. B. O.; BERLANDE, B. M.; DE SOUZA, J. C. Q.; CANDIDO, J. M. B.; JAEGER, L. H.; ADRIANO, L. H. C.; E BRITO, M. A. D. A.; DO NASCIMENTO, M. P.; GERALDO, P. A.; CHELLINI, P. R.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Capillary Electromigration Techniques Applied to Clinical Chemistry Investigations and Alternative Diagnostic Assays:

Possibilities and Perspectives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 34, n. 11, p. 1542–1564, 2023.

MOREIRA, O.; DE SOUZA, J.; CANDIDO, J.; DO NASCIMENTO, M. P.; PENNA, E.; CHELLINI, P.; DE OLIVEIRA, M. Capillary Electrophoresis Applied to Human Urine Analysis for Clinical Diagnosis: New Trends and Perspectives. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 10, n. 39, p. 17–51, 2022.

NBME. **Laboratory Values**. [s. l.], 2024. Disponível em: <https://www.nbme.org/laboratory-values>. Acesso em: 15 jan. 2025.

NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como variar tudo ao mesmo tempo. In: NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. (Eds.). **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2 ed. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2001. p. 83–148.

OGUNTIBEJU, O. O. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 45–63, 2019.

OLIVEIRA, M. A. L. De; SOARES, D. do C.; TOSTES, G. S.; GUIMARÃES, M. do C.; VAZ, F. A. S. Optimization of an Alternative Methodology for Simultaneous Analysis of Nitrite and Nitrate in Water from Urban Stream by Capillary Electrophoresis under Direct UV Detection. **American Journal of Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 3, n. 07, p. 484–490, 2012.

OLSSON, J.; KARLBERG, B.; KRISTENSSON, K.; ABERG, F. Determination of malondialdehyde in rat brain by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 707, p. 51–57, 1998.

OMRANI, A. S.; AL-TAWFIQ, J. A.; MEMISH, Z. A. Middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): Animal to human interaction. **Pathogens and Global Health**, [s. l.], v. 109, n. 8, p. 354–362, 2015.

PAPASTERGIADIS, A.; MUBIRU, E.; VAN LANGENHOVE, H.; DE MEULENAER, B. Malondialdehyde measurement in oxidized foods: Evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) Test in various foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 60, p. 9589–9594, 2012.

PARONI, R.; FERMO, I.; CIGHETTI, G. Validation of methyl malondialdehyde as internal standard for malondialdehyde detection by capillary electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 307, p. 92–98, 2002.

RATERINK, R. J.; LINDENBURG, P. W.; VREEKEN, R. J.; RAMAUTAR, R.; HANKEMEIER, T. Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass spectrometry-based metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 61, p. 157–167, 2014.

RIBANI, M.; BEATRIZ, C.; BOTTOLI, G.; COLLINS, C. H.; SALES, I. C.; JARDIM, F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, [s. l.], v. 84, n. 21–22, p. 705–712, 2009.

ROSA, N. H.; SIMIONI, P. U.; DAMIÃO, B. Evolução do SARS-CoV 2: comparação biológica da epidemia de SARS-CoV-1 com a pandemia de SARS-CoV-2. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 141–145, 2022.

SARKER, R.; ROKNUZZAMAN, A. S. M.; HOSSAIN, M. J.; BHUIYAN, M. A.; ISLAM, M. R. The WHO declares COVID-19 is no longer a public health emergency of international concern: benefits, challenges, and necessary precautions to come back to normal life. **International Journal of Surgery**, [s. l.], v. 109, n. 9, p. 2851–2852, 2023.

SATO, R. T. **Otimização de metodologia alternativa para determinação de ácidos graxos livres, em óleos vegetais, por eletroforese capilar**. 2014. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

SERVÁN, P. R. Obesity and Diabetes. **Nutrición Hospitalaria**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 138–143, 2013.

SIM, A. S.; SALONIKAS, C.; NAIDOO, D.; WILCKEN, D. E. L. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 785, p. 337–344, 2003.

SLATTER, D. A.; BOLTON, C. H.; BAILEY, A. J. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. **Diabetologia**, [s. l.], v. 43, p. 550–57, 2000.

SMAIL, S. W.; BABAEI, E.; AMIN, K. Hematological, Inflammatory, Coagulation, and Oxidative/Antioxidant Biomarkers as Predictors for Severity and Mortality in COVID-19: A Prospective Cohort-Study. **International Journal of General Medicine**, [s. l.], v. 16, p. 565–580, 2023.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. Reações no Carbono Alfa de Compostos Carbonilados. *In*: SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. (Eds.). **Química Orgânica**. 12. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2023. v. 2p. 240–276.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 287–297, 2012.

SRIKANTHAN, K.; FEYH, A.; VISWESHWAR, H.; SHAPIRO, J. I.; SODHI, K. Systematic review of metabolic syndrome biomarkers: A panel for early detection, management, and risk stratification in the West Virginian population. **International Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 25–38, 2016.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, [s. l.], v. 19, p. 173–181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 493–511, 1997.

TOTO, A.; WILD, P.; GRAILLE, M.; TURCU, V.; CRÉZÉ, C.; HEMMENDINGER, M.; SAUVAIN, J. J.; BERGAMASCHI, E.; CANU, I. G.; HOPF, N. B. Urinary Malondialdehyde (MDA) Concentrations in the General Population—A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. **Toxics**, [s. l.], v. 10, n. 4, 2022.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 524, p. 13–30, 2017.

VALENZUELA, A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. **Life Sciences**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 301–309, 1991.

VARGAS, G.; MEDEIROS GERALDO, L. H.; GEDEÃO SALOMÃO, N.; VIANA PAES, M.; REGINA SOUZA LIMA, F.; CARVALHO ALCANTARA GOMES, F. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and glial cells: Insights and perspectives. **Brain, Behavior, and Immunity - Health**, [s. l.], v. 7, p. 100127, 2020.

VERMA, S.; HUSSAIN, M. E. Obesity and diabetes: An update. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 73–79, 2017.

WANG, T.; LUO, D.; CHEN, Z.; QU, Y.; MA, X.; YE, J.; CHU, Q.; HUANG, D. Sensitive determination of aldehyde metabolites in exhaled breath condensate using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 410, n. 27, p. 7203–7210, 2018.

WHO. **WHO COVID-19 dashboard**. [s. l.], 2024a. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=c>. Acesso em: 10 jan. 2025.

WHO. **Obesity and overweight**. [s. l.], 2024b. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 16 jan. 2025.

WHO. **MERS situation update, May 2024**. Nasr City, 2024c. Disponível em: <https://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>. Acesso em: 10 jan. 2025.

WHO. **Pandemia da doença do coronavírus (COVID-19)**. [s. l.], 2025. Disponível em: <https://www.who.int/europe/emergencies/situations/covid-19>. Acesso em: 10 jan. 2025.

WILSON, D. W.; METZ, H. N.; GRAVER, L. M.; RAO, P. S. Direct Method for Quantification of Free Malondialdehyde with High- Performance Capillary Electrophoresis in Biological Samples. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 43, n. 10, p. 1982–1984, 1997.

XU, R.-H.; HE, J.-F.; EVANS, M. R.; PENG, G.-W.; FIELD, H. E.; YU, D.-W.; LEE, C.-K.; LUO, H.-M.; LIN, W.-S.; LIN, P.; LI, L.-H.; LIANG, W.-J.; LIN, J.-Y.; SCHNUR, A. Epidemiologic Clues to SARS Origin in China. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1030–1037, 2004.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 111, p. 5944–5972, 2011.

ZINELLU, A.; SOTGIA, S.; DEIANA, L.; CARRU, C. Field-amplified sample injection combined with pressure-assisted capillary electrophoresis UV detection for the simultaneous analysis of allantoin, uric acid, and malondialdehyde in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [*s. l.*], v. 399, p. 2855–2861, 2011. a.

ZINELLU, A.; SOTGIA, S.; DEIANA, L.; CARRU, C. Field-amplified online sample stacking capillary electrophoresis UV detection for plasma malondialdehyde measurement. **Electrophoresis**, [*s. l.*], v. 32, p. 1893–1897, 2011. b.

**APÊNDICE A – Artigos publicados durante o Doutorado**

1 – VITRAL, J. M. P. M.; NASCIMENTO, M. P.; OLIVEIRA, M. A. L. Alternative method using Multiple-Injection Capillary Zone Electrophoresis with direct UV detection and single-point standard addition for determination of sorbate and benzoate in ready-to-drink tea. **Microchemical Journal**, v. 208, p. 112558, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.112558>.

2 – NASCIMENTO, M. P., MARINHO, M. V.; SOUSA, R. A.; OLIVEIRA, M. A. L. Mixture design of an electrolyte system for the simultaneous separation of  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , and  $\text{HCO}_3^-$  in shrimp-farming water. **Analytical Methods**, v. 15, p. 311-321, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1039/D2AY01619B>.

3 – MOREIRA, O. B. O.; SOUZA, J. C. Q.; CANDIDO, J. M. B.; NASCIMENTO, M. P.; CHELLINI, P. R.; LEMOS, L. M.; OLIVEIRA, M. A. L. Determination of creatinine in urine and blood serum human samples by CZE-UV using on-column internal standard injection. **Talanta**, v. 258, p. 124465, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124465>.

4 – MOREIRA, O. B. O.; SOUZA, J. C. Q.; CANDIDO, J. M. B.; NASCIMENTO, M. P.; CHELLINI, P. R.; LEMOS, L. M.; OLIVEIRA, M. A. L. Factorial design applied to LC-ESI-QTOF mass spectrometer parameters for untargeted metabolomics. **Analytical Methods**, v. 15, p. 2512-2521, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1039/D3AY00094J>.

5 – MOREIRA, O. B. O.; BERLANDE, B.; SOUZA, J. C. Q.; CANDIDO, J. M. B.; JAEGER, L.; ADRIANO, L. H.; BRITO, M. A.; NASCIMENTO, M. P.; GERALDO, P.; CHELLINI, P.; OLIVEIRA, M. A. L. Capillary Electromigration Techniques Applied to Clinical Chemistry Investigations and Alternative Diagnostic Assays: Possibilities and Perspectives. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 00, p. 1-23, 2023. DOI: <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20230096>.

6 – NASCIMENTO, M. P.; BERLANDE, B. M.; LOPES, M. G. F.; LIMA, M. F. C.; SOUZA, C. T.; OLIVEIRA, M. A. L. Malondialdehyde Analysis in Biological Samples by Capillary Electrophoresis: The State of Art. **Critical Reviews In Analytical Chemistry**, v. 00, p. 1-13, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408347.2023.2296948>.

7 – GERALDO, P. A.; VELASCO, A. W. C.; BERLANDE, B. M.; SOUZA, J. C. Q.; CANDIDO, J. M. B.; ADRIANO, L. H. C.; BRITO, M. A. D. A.; **NASCIMENTO, M. P.**; MOREIRA, O. B. O.; OLIVEIRA, M. A. L. Fatty acids analysis by capillary electrophoresis: Fundamentals, advantages and applications. **Electrophoresis**, v. 45, p. 35-54, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.202300144>.

8 – MACHADO, E. G.; LIMA, N. M.; **NASCIMENTO, M. P.**; SILVA, H. T.; SOUZA, C. A.; ANDRADE, T. J. A. S.; FARIA, M. C. S.; CASTRO, S. B. R.; OLIVEIRA, M. A. L.; CARLI, A. P.; ALVES, C. C. S. In vivo anti-inflammatory action evaluation of protease inhibitors from *Cecropia hololeuca* and their protein profile by electrophoretic and spectroscopic techniques. **South African Journal of Botany**, v. 144, p. 10-17, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.08.030>.

9 – **NASCIMENTO, M. P.**; MARQUES, R.; PEREIRA, M. P.; MARTINS, R. S.; BOMBONATO, F. I.; OLIVEIRA, M. A. L. Determination of purity and anionic exchange efficiency of amino acid ionic liquids synthesis by multiple-injection capillary zone electrophoresis. **Talanta**, v. 237, p. 122945, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122945>.

10 – LIMA, N. M.; FERNANDES, B. L. M.; ALVES, G. F.; SOUZA, J. C. Q.; SIQUEIRA, M. M.; **NASCIMENTO, M. P.**; MOREIRA, O. B. O.; SUSSULINI, A.; OLIVEIRA, M. A. L. Mass spectrometry applied to diagnosis, prognosis, and therapeutic targets identification for the novel coronavirus SARS-CoV-2: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1195, p. 339385, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339385>.

11 – MOREIRA, O.; SOUZA, J.; CANDIDO, J.; **NASCIMENTO, M. P.**; PENNA, E.; CHELLINI, P.; OLIVEIRA, M. Capillary Electrophoresis Applied to Human Urine Analysis for Clinical Diagnosis: New Trends and Perspectives. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. RV-13, p. 1, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.RV-13-2022>.

12 – KLASSEN, A.; FERNANDES, R. F.; OLIVEIRA, D. C.; **NASCIMENTO, M. P.**; BORGES, M. M. C.; OLIVEIRA, M. A. L.; CALIXTO, L. A.; BORGES, K. B. Short-End Injection Capillary Electrophoresis and Multivariate Analysis for Simultaneous Determination

of Heavy Metals in Passiflora incarnata Tea. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, p. 15994, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph192315994>.

13 – CARVALHO, G. S. G.; SIQUEIRA, M. M.; **NASCIMENTO, M. P.**; OLIVEIRA, M. A. L.; AMARANTE, G. W. Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> supported in mixed oxides catalyzed mineralization process of methylene blue. **Heliyon**, v. 6, p. e04128-000, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04128>.

14 – LIMA, N. M.; SILVEIRA, R. S.; SANTOS, V. N.; **NASCIMENTO, M. P.**; ANDRADE, T. J.; CARLI, A. P.; OLIVEIRA, M. A. L.; ALMEIDA, M. V. Bioactivity and Dereplication of Phenolic Compounds in Medicinal Plants. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 11, p. 105-110, 2019. DOI: 10.25004/IJPSDR.2019.110306.

**APÊNDICE B – Artigos em escrita/submissão**

1 – Título: “Investigation of fatty acids in biological fluid samples and analysis by capillary electrophoresis: state of the art and applications”.

Autores: Patrícia Abranches Geraldo, Maria Patrícia do Nascimento, Bruna Marchiori Berlande, Jéssica Cordeiro Queiroz de Souza, Luiz Henrique Cantarino Adriano, Marcone Augusto Leal de Oliveira.

Revista: Electrophoresis.

*Status:* Submetido.

2 – Título: “Application of electrophoretic parameters to calculate the radius of solutes”.

Autores: Maria Patrícia do Nascimento, Marciel Vaz Marinho, Bruna Marchiori Berlande, Pedro Pereira Rezende de Moura, Gustavo Fernandes Souza Andrade, Marcone Augusto Leal de Oliveira.

*Status:* Em escrita.

3 – Título: “Investigation of malondialdehyde in urine samples by Capillary Electrophoresis”.

Autores: Maria Patrícia do Nascimento, Olívia Brito de Oliveira Moreira, Bruna Marchiori Berlande, Lúcio Marco de Lemos, Claudio Teodoro de Souza, Marcone Augusto Leal de Oliveira.

*Status:* Em escrita.

4 – Título: “Antioxidants analysis in biological samples by Capillary Electrophoresis: Applications and perspectives”.

Autores: Maria Patrícia do Nascimento, Bruna Marchiori Berlande, Marina Guedes Fraga Lopes, Mário Flávio Cardoso de Lima, Claudio Teodoro de Souza, Marcone Augusto Leal de Oliveira.

*Status:* Em escrita.

**APÊNDICE C – Capítulos de livros publicados**

1 – OLIVEIRA, M. A. L.; CAMPOS, G. P.; SOUZA, J. C. Q.; **NASCIMENTO, M. P.**; LIMA, N. M.; MOREIRA, O. B. O.; CHELLINI, P. R.; AMORIM, T. L. Recent Trends in the Analysis of Lipids, Carbohydrates, and Proteins in Food by Capillary Electrophoresis. *In*: HERRERO, M. C. P.; HERRERO, M; MARINA, M. L. **Current and Future Developments in Food Science: Capillary Electrophoresis in Food Analysis**. 1. ed. Sharjah: Bentham Science, 2022, v. 2, p. 63-108. DOI: [10.2174/9789815036152122020006](https://doi.org/10.2174/9789815036152122020006).

## **APÊNDICE D – Participação em eventos**

1 – 21st Brazilian Meeting on Analytical Chemistry and 9th Ibero-American Congress of Analytical Chemistry. Fatty acids analysis by Capillary Electrophoresis: Fundamentals, advantages, and applications. 2024. (Congresso).

2 – 20th ENQA - Brazilian Meeting on Analytical Chemistry and 8th CIAQA - Congresso Ibero-Americano de Química Analítica. Capillary Electrophoresis with UV detection applied to analysis of urinary organic acids for targeted metabolomics. 2022. (Congresso).

## **APÊNDICE E – Participação em projetos**

1 – Projeto: “Técnicas de eletromigração e cromatográficas aplicadas ao estudo de metaboloma da urina para o diagnóstico da COVID-19”.

O projeto foi coordenado pelo Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira em parceria com o Lemos Laboratórios de Análises Clínicas.

2 – Projeto: “Programa de monitoramento de gordura trans em alimentos”.

O projeto foi coordenado pelo Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira em parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Os integrantes do projeto foram Jéssica Cordeiro Queiroz de Souza, Maria Patrícia do Nascimento, Olivia Brito de Oliveira Moreira e Patrícia Abranches Geraldo.

As atividades executadas consistiram de desenvolvimento e otimização do protocolo analítico por Eletroforese Capilar, aquisição, preparo e análise das amostras, processamento de dados e elaboração de relatórios.

**APÊNDICE F – Participação em bancas de trabalhos de conclusão**

1 – CHELLINI, P. R.; SOUZA, J. C. Q.; **DO NASCIMENTO, MARIA PATRÍCIA**; ADRIANO, LUIZ HENRIQUE CANTARINO; Nianderson Pereira de Assis. Participação em banca de Marcos Fraga Carvalhal. Desenvolvimento de Método para Detecção de Produtos de Degradação da Cloroquina em Eletroforese Capilar. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora.

2 – CHELLINI, P. R.; **DO NASCIMENTO, MARIA PATRÍCIA**; SOUZA, J. C. Q.; Eduarda Silva Paim. Participação em banca de Eduarda Nassur Guida. Determinação dos Parâmetros do Sistema Cromatográfico aplicando Analytical Quality by Design no Desenvolvimento de Métodos de Doseamento por HPLC. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora.

## **APÊNDICE G – Coorientação de Projeto de Iniciação Científica**

1 – Título: “Desenvolvimento e otimização de método para a determinação de vitamina E e coenzima Q10 em cosméticos por Eletroforese Capilar”.

Discente: Bruna Marchiori Berlande

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientadora: Ma. Maria Patrícia do Nascimento

2 – Título: “Desenvolvimento, otimização e validação de métodos para a determinação de vitamina C, vitamina E e coenzima Q10 em cosméticos por Eletroforese Capilar”.

Discente: Bruna Marchiori Berlande

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientadora: Ma. Maria Patrícia do Nascimento

3 – Título: “Desenvolvimento, otimização e validação de método para a determinação de cobre e zinco em urina por Eletroforese Capilar”.

Discente: Pedro Pereira Rezende de Moura

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientadora: Ma. Maria Patrícia do Nascimento

**APÊNDICE H – Coorientação de Trabalho de Conclusão de Curso**

1 – Título: “Análise de ácido sórbico e ácido benzoico em amostras de bebidas comerciais de chá pronto para consumo por eletroforese capilar”.

Discente: Julia Maria Pires de Matos Vitral

Orientador: Prof. Dr. Marcene Augusto Leal de Oliveira

Coorientadora: Ma. Maria Patrícia do Nascimento